

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
10. Oktober 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/079765 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 21/77,**  
21/55, 21/64

Markus [CH/CH]; Im Brül 6, CH-4312 Magden (CH).  
**MAROWSKY, Gerd** [DE/DE]; Mühlspielweg 19, 37077  
Göttingen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/02958

(74) Gemeinsamer Vertreter: **ZEPTOSENS AG**; Benken-  
strasse 254, CH-4108 Witterswil (CH).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
18. März 2002 (18.03.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
0617/01 2. April 2001 (02.04.2001) CH  
0689/01 12. April 2001 (12.04.2001) CH

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,  
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,  
ZA, ZW.

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US*): **ZEPTOSENS AG** [CH/CH]; Benkenstrasse 254,  
CH-4108 Witterswil (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **DUVENECK, Gert,**  
**L.** [DE/DE]; Ezmattenweg 34, 79189 Bad Krozingen  
(DE). **BOPP, Martin, A.** [CH/CH]; Brunnmattstrasse  
5, CH-4053 Basel (CH). **PAWLAK, Michael** [DE/DE];  
Andelsbachstrasse 5, 79225 Laufenburg (DE). **EHRAT,**

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: OPTICAL STRUCTURE FOR MULTI-PHOTON EXCITATION AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: OPTISCHE STRUKTUR ZUR MULTI-PHOTONEN-ANREGUNG UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a variable embodiment of an optical structure, comprising an optical waveguide with a wave-guiding layer (a) that is transparent at at least one excitation wavelength. Said optical structure is characterised in that the intensity of excitation light that is input into the layer (a) and guided through said layer (a) is sufficiently high on and in said layer (a) to excite molecules capable of luminescence and/or photoreactive molecules located on the surface of the layer (a) or at a distance of less than 200 nm from the latter (a), by means of multi-photon excitation, preferably two-photon excitation. Preferred embodiments are those which allow a linear or planar multi-photon excitation along the excitation light that is guided through the layer (a). The invention also relates to various embodiments of optical systems and analytical systems comprising an excitation light source and an inventive embodiment of an optical structure and to methods based thereon, in particular to luminescence excitation and to the luminescent detection of one or several analytes by means of multi-photon excitation, in addition to the use of said embodiments and methods.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine variable Ausführungsform einer optischen Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche, lumineszenzfähige und/oder photoreaktive Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung, vorzugsweise 2-Photonen-Anregung, anzuregen. Bevorzugt sind dabei solche Ausführungsformen, welche eine linienhafte oder flächenhafte Multi-Photonen-Anregung, längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, ermöglichen. Die Erfindung betrifft auch verschiedene Ausführungsformen optischer Systeme und analytischer Systeme mit einer Anregungslichtquelle und einer erfindungsgemässen Ausführung einer optischer Struktur sowie darauf basierende Verfahren, insbesondere zur Lumineszenzanregung sowie zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten mittels Multi-Photonen-Anregung, sowie deren Verwendung.

WO 02/079765 A2



*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

## **Optische Struktur zur Multi-Photonen-Anregung und deren Verwendung**

Die Erfindung betrifft eine variable Ausführungsform einer optischen Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche, lumineszenzfähige und / oder photoreaktive Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung, vorzugsweise 2-Photonen-Anregung, anzuregen. Bevorzugt sind dabei solche Ausführungsformen, welche eine linienhafte oder flächenhafte Multi-Photonen-Anregung, längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, ermöglichen. Die Erfindung betrifft auch verschiedene Ausführungsformen optischer Systeme und analytischer Systeme mit einer Anregungslichtquelle und einer erfindungsgemässen Ausführung einer optischen Struktur sowie darauf basierende Verfahren, insbesondere zur Lumineszenzanregung sowie zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten mittels Multi-Photonen-Anregung, sowie deren Verwendung.

Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von optischen Strukturen und einfach durchführbaren optischen Verfahren, um im Nahfeld der wellenleitenden Schicht der Struktur, d.h. auf dieser Struktur oder in einem Abstand von weniger als etwa 200 nm, eine Multi-Photonen-Anregung lumineszenzfähiger und / oder photoreaktiver Moleküle zu ermöglichen.

Im Rahmen dieser Erfindung wird unter einer „Multi-Photonen-Anregung“ verstanden, dass ein Molekül (oder eine molekulare Gruppe) mehrere Photonen einer eingestrahnten Anregungswellenlänge absorbiert, bevor es (sie) aus dem daraus resultierenden angeregten Zustand in einen anderen Zustand, insbesondere den Grundzustand,

zurückkehrt. Das Resultat einer solchen Multi-Photonen-Anregung kann eine bei der Rückkehr in den Grundzustand ausgestrahlte Lumineszenz, insbesondere Fluoreszenz, mit kürzerer Wellenlänge als der eingestrahlten Anregungswellenlänge sein. Es kann aber auch in der Überwindung der Aktivierungsenergie zum Übergang in einen photoreaktiven Zustand bestehen. Dieser photoreaktive Zustand kann zur Ausbildung von molekularen Bindungen zu anderen Molekülen oder Molekülkomplexen führen (z. B. in Form einer Photopolymerisation) oder auch zum Bruch bestehender Bindungen (Photodissoziation, gegebenenfalls gefolgt von einer Desorption). Entsprechend wird unter einer „Ein-Photonen-Anregung“ verstanden, dass ein Molekül durch Absorption eines einzelnen Photons in besagten angeregten Zustand angeregt wird.

Unter dem Begriff Molekül soll nachfolgend, sofern nicht explizit anders bezeichnet, der Begriff „molekulare Gruppe“ (wie z. B. ein Fluoreszenzlabel als Teil eines fluoreszenzmarkierten Moleküls) subsumiert sein.

Beispielsweise in der biochemischen Analytik besteht ein hoher Bedarf nach Anordnungen und Methoden, mit denen, unter Verwendung von auf einer Oberfläche immobilisierten biochemischen oder biologischen oder synthetischen Erkennungselementen, ein in einer zugeführten Probe befindlicher Analyt mit hoher Selektivität und Empfindlichkeit nachgewiesen werden kann. Viele bekannte Nachweismethoden stützen sich dabei auf die Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen in Anwesenheit des Analyten.

Mit dem Begriff „Lumineszenz“ wird dabei in dieser Anmeldung die spontane Emission von Photonen im ultravioletten bis infraroten Bereich nach optischer oder nichtoptischer, wie beispielsweise elektrischer oder chemischer oder biochemischer oder thermischer Anregung, bezeichnet. Beispielsweise sind Chemilumineszenz, Biolumineszenz, Elektrolumineszenz und insbesondere Fluoreszenz und Phosphoreszenz unter dem Begriff „Lumineszenz“ mit eingeschlossen.

Der Begriff "optische Transparenz eines Materials" wird im folgenden in dem Sinne verwendet, dass die Transparenz dieses Materials bei mindestens einer Anregungswellenlänge gefordert wird. Bei einer längeren oder kürzeren Wellenlänge kann dieses Material auch absorbierend sein.

Mittels hochbrechender Dünnschichtwellenleiter, basierend auf einem nur einige hundert Nanometer dünnen wellenleitenden Film auf einem transparenten Trägermaterial, konnte in den letzten Jahren die Empfindlichkeit deutlich gesteigert werden. Beispielsweise wird in der WO 95/33197 eine Methode beschrieben, in der das Anregungslicht über ein Reliefgitter als diffraktives optisches Element in den wellenleitenden Film eingekoppelt wird. Die Oberfläche der Sensorplattform wird mit einer den Analyten enthaltenden Probe in Kontakt gebracht, und die isotrop abgestrahlte Lumineszenz in der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes befindlicher lumineszenzfähiger Substanzen wird mittels geeigneter Messvorrichtungen wie zum Beispiel Photodioden, Photomultiplier oder CCD-Kameras gemessen. Es ist auch möglich, den in den Wellenleiter rückgekoppelten Anteil der evaneszent angeregten Strahlung über ein diffraktives optisches Element, zum Beispiel ein Gitter, auszukoppeln und zu messen. Diese Methode ist zum Beispiel in der WO 95/33198 beschrieben.

Die Begriffe "evaneszentes Feld" und "Nahfeld" werden nachfolgend synonym verwendet.

Ein Nachteil aller oben im Stand der Technik, insbesondere in der WO 95/33197 und WO 95/33198 beschriebenen Verfahren zur Detektion evaneszent angeregter Lumineszenz liegt darin, dass auf der als homogener Film ausgebildeten wellenleitenden Schicht der Sensorplattform jeweils nur eine Probe analysiert werden kann. Um weitere Messungen auf derselben Sensorplattform durchführen zu können, sind fortlaufend aufwendige Wasch- bzw. Reinigungsschritte notwendig. Dieses gilt insbesondere, wenn ein von der ersten Messung verschiedener Analyt detektiert werden soll. Im Falle eines Immunoassays bedeutet dieses im allgemeinen, dass die gesamte immobilisierte Schicht

auf der Sensorplattform ausgetauscht oder gleich eine neue Sensorplattform als Ganzes verwendet werden muss.

Es besteht daher zugleich das Bedürfnis, ein Verfahren zu entwickeln, welches es erlaubt, parallel, das heisst gleichzeitig oder direkt hintereinander ohne zusätzliche Reinigungsschritte, mehrere Proben zu analysieren.

Zur gleichzeitigen oder aufeinanderfolgenden Durchführung von ausschliesslich lumineszenzbasierenden Mehrfachmessungen mit im wesentlichen monomodalen, planaren anorganischen Wellenleitern sind, z. B. in der WO 96/35940, Vorrichtungen (Arrays) bekannt geworden, in denen auf einer Sensorplattform wenigstens zwei getrennte wellenleitende Bereiche angeordnet sind, die getrennt mit Anregungslicht bestrahlt werden. Die Aufteilung der Sensorplattform in getrennte wellenleitende Bereiche hat allerdings nachteilig zur Folge, dass der Platzbedarf für diskrete Messbereiche, in diskreten wellenleitenden Bereichen auf der gemeinsamen Sensorplattform relativ gross ist und daher wieder nur eine verhältnismässige geringe Dichte unterschiedlicher Messfelder (oder sogenannter "features") erreicht werden kann.

Es besteht daher ausserdem der Bedarf nach einer Vergrösserung der Feature-Dichte bzw. nach einer Verkleinerung der erforderlichen Fläche pro Messbereich.

Basierend auf einfachen Glas- oder Mikroskop-Plättchen, ohne zusätzliche wellenleitende Schichten, sind Arrays mit einer sehr hohen Feature-Dichte bekannt. Beispielsweise werden in der US 5445934 (Affymax Technologies) Arrays von Oligonukleotiden mit einer Dichte von mehr als 1000 Features pro Quadratzentimeter beschrieben und beansprucht. Die Anregung und das Auslesen solcher Arrays beruht auf klassischen optischen Anordnungen und Methoden. Es kann das ganze Array gleichzeitig mit einem aufgeweiteten Anregungslichtbündel beleuchtet werden, was jedoch zu einer relativ geringen Empfindlichkeit führt, da die Anregung nicht auf die wechselwirkende Oberfläche beschränkt ist und da ausserdem der Streulichtanteil relativ gross ist und Streulicht oder Untergrundfluoreszenzlicht aus dem Glassubstrat auch in den Bereichen

erzeugt wird, in denen sich keine zur Bindung des Analyten immobilisierten Oligonukleotide befinden. Um die Anregungsintensität zu erhöhen und die Empfindlichkeit bei der Detektion zu verbessern, werden vielfach konfokale Messanordnungen eingesetzt und die verschiedenen Features sequentiell mittels "Scannen" ausgelesen. Dieses hat jedoch einen grösseren Zeitaufwand zum Auslesen eines grossen Arrays und einen relativ komplexen optischen Aufbau zur Folge.

Es besteht daher das Bedürfnis nach einer Ausgestaltung der Sensorplattform und nach einer optischen Messanordnung, womit eine ebenso hohe oder sogar noch höhere Empfindlichkeit erzielt werden kann, wie diese mit Sensorplattformen basierend auf Dünnschichtwellenleitern erreicht wurde, und mit der zugleich die Messfläche pro Feature minimiert werden kann.

In einer co-pendenden Anmeldung (PCT/EP 00/04869) wird eine Sensorplattform mit einem Schichtwellenleiter, umfassend eine optisch transparente Schicht (a) auf einer zweiten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und einer in der optisch transparenten Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c) mit darauf erzeugten Messbereichen beschrieben. Dabei kann durch geeignete Wahl der Parameter, insbesondere der Gittertiefe, nach Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen und damit verbundener Lumineszenzanregung im Nahfeld der Schicht (a) das in die Schicht (a) rückgekoppelte Lumineszenzlicht über kürzeste Strecken, d.h. wenige hundert Mikrometer vollständig ausgekoppelt und damit an einer weiteren Ausbreitung in der wellenleitenden Schicht (a) gehindert werden.

Durch diese Anordnung ist es möglich, einen hochempfindlichen gleichzeitigen Nachweis einer Vielzahl von Analyten auf sehr engem Raum durchzuführen. Durch Optimierung der Strahlengänge und Ausblenden von Reflexionen oder Streulicht kann die Empfindlichkeit weiter gesteigert werden, jedoch bleiben schliesslich die Untergrundsignale und das damit verbundene Rauschen des Untergrunds limitierend. Dieses ist für diese, ebenso wie für alle vorgenannten Anregungs- und Detektionskonfigurationen, unter anderem dadurch bedingt, dass bei den meisten verwendeten

Lumineszenzfarbstoffen der spektrale Abstand zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge (Stokes-Shift) relativ gering ist, typischerweise zwischen 20 nm und 50 nm. Zwar sind einige Lumineszenzfarbstoffe bekannt, welche einen grossen Stokes-Shift, bis etwa 300 nm, aufweisen, wie beispielsweise einige Lanthanid-Komplexe. Diese besitzen nachteilig jedoch im allgemeinen eine relativ niedrige Quantenausbeute und / oder Photostabilität.

Ausserdem ist bei den bekannten Anordnungen basierend auf hochbrechenden Dünnschichtwellenleitern, beispielsweise basierend auf wellenleitenden Schichten aus  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  oder  $\text{TiO}_2$ , mit herkömmlicher Anregung nachteilig, dass die Ausbreitungsverluste dieser Wellenleiter, wie auch die Eigenfluoreszenz dieser Dünnschichtwellenleiter (beispielsweise durch Spuren von fluoreszenten Verunreinigungen in der Schicht (b)), bei kurzen Anregungswellenlängen drastisch ansteigen. So ist hier kurzwellige Anregung bei etwa 450 nm bis 500 nm limitiert. Es wäre jedoch eine Anordnung wünschenswert, mit der Fluorophore auch bei kürzeren Wellenlängen angeregt werden und ihre Lumineszenzen mit einem möglichst niedrigen oder bestenfalls sogar ohne Untergrund detektiert werden können.

Seit kurzem sind Methoden bekannt geworden, welche eine nahezu hintergrundfreie Lumineszenzdetektion erlauben und auf Multi-Photonen-Anregung, insbesondere 2-Photonen-Anregung beruhen. Eine 2-Photonen-Anregung erfordert jedoch extrem hohe Feldstärken bzw. Intensitäten des Anregungslichts. Diese erreicht man in den beschriebenen Anordnungen mit leistungsstarken Pulslasern extrem kurzer Pulslängen (typischerweise von Femtosekunden). Diese optischen Anordnungen sind jedoch mit sehr hohen Systemkosten verbunden und stellen hohe Anforderungen an die fachliche Qualifikation des Benutzers. Sie sind daher für routinemässige Anwendungen, ausserhalb des Forschungsbereichs, nicht geeignet. Beispielsweise wird in einer sehr frühen Arbeit, in der US 3572941 aus dem Jahre 1967, zur Entwicklung von Anordnungen für 3-dimensionale Bildwiedergabe und -speicherung, beschrieben, dass beispielsweise zur (permanenten) Änderung der optischen Dichte eines Speichermediums, z. B. eines Einkristalles, beispielsweise  $\text{CaF}_2$  dotiert mit La,



Anregungsintensitätsdichten in der Grössenordnung von mindestens  $20 \text{ MW/cm}^2$  erforderlich sind. Solche Intensitätsdichten sind beispielsweise mit gepulsten Hochleistungslasern in konfokalen mikroskopischen Anordnungen erreicht und beschrieben worden, wie zum Beispiel in der US 5034613 mit einem Laserfokusedurchmesser von weniger als einem Mikrometer in der Fokusebene des Mikroskops. Die Ausmessung einer ausgedehnten Fläche mittels Scannens erfordert jedoch wiederum neben dem grossen instrumentellen Aufwand nachteilig auch einen hohen Zeitaufwand.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass mit einer optischen Struktur, basierend auf einem Dünnschichtwellenleiter mit einer bei mindestens bei der Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) bei geeigneter Wahl der physikalischen Parameter und unter Einsatz ausreichend hoher Anregungslichtintensitäten die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.

Mit einer bevorzugten Ausführungsform einer erfindungsgemässen optischen Struktur, ausgebildet als ein planarer Dünnschicht-Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b)' mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c), konnte überraschend gezeigt werden, dass die Intensität eines unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahnten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) sogar längs des gesamten Ausbreitungsweges des Anregungslichts in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um linienhaft und sogar flächenhaft längs dieses Ausbreitungsweges eine 2-Photonen-Anregung auf der Schicht (a) immobilisierter lumineszenzfähiger Moleküle zu ermöglichen. Dabei kann durch 2-

Photonen-Absorption eine so starke Lumineszenz erzeugt werden, dass sie sogar bei Raumlicht mit bloßem Auge erkennbar ist.

Während bis jetzt eine Multi-Photonen-Anregung nur auf kleinstem Raum, nämlich im Fokus leistungsstarker (im allgemeinen mit hoher Repetitionsrate gepulster) Laser (typischerweise Femtosekunden-Laser) möglich war, ermöglicht die vorliegende Erfindung eine gleichzeitige 2-Photonen-Lumineszenz-Anregung und -Beobachtung in makroskopischen Ausdehnungen, d.h. über Längen von Millimetern bis Zentimetern und auf Flächen von Quadratmillimetern bis Quadratzentimetern. Zugleich können dank der vorliegenden Erfindung die Anforderungen an die Pulsenergien der Anregungslichtquellen während eines einzigen Pulses deutlich gesenkt werden, was bedeutet, dass auch die Verwendung längerpulsiger Laser (z. B. von Pikosekunden- oder sogar Nanosekunden-Lasern anstelle von Femtosekunden-Lasern) oder sogar von kontinuierlich emittierenden (cw) Lasern zur Multi-Photonen-Lumineszenzanregung mit einer erfindungsgemässen optischen Struktur möglich wird.

Ein wesentlicher Vorteil einer Lumineszenzanregung, insbesondere zum Analytnachweis mithilfe oberflächengebundener Erkennungselemente für den Analyten, mittels Multi-Photonen-Anregung im evaneszenten Feld eines Wellenleiters, im Vergleich zur klassischen Anregung mittels Ein-Photonen-Absorption, ist eine nochmals deutlich verschärfte Selektivität der Anregung mit wachsendem Abstand von der hochbrechenden Wellenleiter-Oberfläche. Während die Stärke des evaneszenten Feldes, und (proportional dazu) damit die Intensität einer in diesem Feld nach klassischer Ein-Photonen-Anregung erzeugten Lumineszenz, exponentiell mit dem Abstand  $x$  abfällt, ist die Abnahme bei Lumineszenz nach  $n$ -Photonen-Absorption proportional zu  $1 / e^{nx}$ , für den Fall der 2-Photonen-Anregung also proportional zu  $1 / e^{2x}$ .

Aufgrund der mit relativ geringem Aufwand erreichbaren sehr hohen, oberflächengebundenen Anregungslichtintensitäten, die aufgrund der sehr hohen Verstärkungsfaktoren selbst für vergleichsweise niedrige eingestrahlte Anregungsintensitäten erreicht werden können, eignen sich erfindungsgemässe optische

Strukturen für den Einsatz in einer Vielzahl verschiedener technischer Gebiete, auch ausserhalb der Bioanalytik, beispielsweise zur Untersuchung photophysikalischer oder photochemischer Eigenschaften insbesondere neuer Materialien unter dem Einfluss hoher Anregungslichtintensitäten.

Insbesondere können, wie nachfolgend genauer für die verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung beschrieben, photoreaktive Moleküle oder Molekülgruppen innerhalb des genannten sehr kleinen Abstands von der wellenleitenden Schicht der Struktur (z-Richtung) mittels Multi-Photonen-Anregung, vorzugsweise 2-Photonen-Anregung, zu chemischen Reaktionen angeregt werden. Diese können in der Ausbildung chemischer Bindungen zu benachbarten Molekülen bestehen, beispielsweise mit dem Ergebnis einer Photopolymerisation, mit welcher auf einfache Weise räumliche Strukturen mit Abmessungen von molekularer Grösse in z-Richtung erzeugt werden, oder in dem oberflächennahen, selektiven Aufbrechen molekularer Bindungen auf einer makroskopischen Grundfläche, woraus sich beispielsweise neue vereinfachte Methoden für die Massenspektrometrie, insbesondere MALDI/TOF-MS (matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry) sowie für molekulare Trennungen, als eine neue, optische Chromatographie-Methode, ergeben.

Erster Gegenstand der Erfindung ist eine optische Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle oder molekulare Gruppen mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Vorzugsweise handelt es sich bei besagtem optischem Wellenleiter um einen optischen Dünnschichtwellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser

Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a).

Eine Gruppe von Ausführungsformen der erfindungsgemässen optischen-Struktur ist dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) durch Multi-Photonen-Anregung angeregten Molekülen um photoreaktive, d.h. nach Lichtanregung chemisch reaktive Moleküle oder molekulare Gruppen handelt. Diese photoreaktiven Moleküle können beispielsweise sogenannte Photo-Initiatoren sein, welche bei Einstrahlung eines geeigneten, typischerweise kurzwelligen Anregungslichts (z.B. UV-Licht) eine Photopolymerisation auslösen. Diese besondere Ausführungsform ist also dadurch gekennzeichnet, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photopolymerisation ausgelöst wird. Gegenüber dem Stand der Technik ergeben sich daraus zweierlei Vorteile. Zum einen kann, unter Einstrahlung verhältnismässig geringer Anregungsintensitäten in Oberflächennähe (definiert durch den Abstand  $z$  von der wellenleitenden Schicht (a) der Struktur, innerhalb dessen für die betreffende Verbindung eine 2-Photonen-Anregung möglich ist) effizient eine Polymerisation angeregt werden. Andererseits können, gegeben durch den Abstand  $z$ , auf einfache Weise äusserst flache (d.h. von molekularer Grösse) räumliche Strukturen erzeugt werden. Die linien- oder flächenhafte Ausdehnung, parallel zur Oberfläche der optischen Struktur, wird dabei begrenzt durch die Ausbreitungslänge des eingestrahnten Anregungslichts innerhalb der wellenleitenden Schicht (a). Sofern der Prozess der Photopolymerisation auf einer in der Schicht (a) modulierten Gitterstruktur, zur gleichzeitigen Ein- und Auskopplung des Anregungslichts (siehe ausführlichere Beschreibung weiter unten) stattfindet, können auch Polymerstrukturen sehr kleiner lateraler Ausdehnungen (in der Grössenordnung von Mikrometern) erzeugt oder „geschrieben“ werden (durch laterale Bewegung der optischen Struktur bezüglich des eingestrahnten Anregungslichts).

Kennzeichen einer anderen Ausführungsform einer erfindungsgemässen optischen Struktur ist, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photodissoziation, d.h. Aufspaltung eines bis zu der Multi-Photonen-Anregung bestehenden Moleküls oder molekularen Komplexes auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zu der Schicht (a) ausgelöst wird.

Eine besondere Variante besteht dabei darin, dass besagte photoreaktive Moleküle Bestandteil einer Molekülmatrix zur Einbettung von Molekülen höheren Molekulargewichts, insbesondere von natürlichen und künstlichen Polymeren bzw. von biologischen Molekülen wie Proteinen, Polypeptiden und Nukleinsäuren, sind. Besonders bevorzugt ist dabei eine solche Ausführungsform, welche darin besteht, dass es sich bei der optischen Struktur um einen Probenträger für die Massenspektrometrie, vorzugsweise für MALDI/TOF-MS (matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry) handelt.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform ist eine optische Struktur, umfassend einen optischen Dünnschicht-Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.

Die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) kann über ein oder mehrere optische Einkoppelemente aus der Gruppe erfolgen, die von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der

wellenleitenden Schicht angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern gebildet wird.

Es wird bevorzugt, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) erfolgt.

Ausserdem wird bevorzugt, dass es sich bei der optischen Struktur um eine planare Dünnschicht-Wellenleiter-Struktur handelt.

Besonders bevorzugt wird eine Ausführungsform der erfindungsgemässen optischen Struktur, umfassend einen planaren Dünnschicht-Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c), welche dadurch gekennzeichnet ist, dass die Intensität eines unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahlten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) zumindest im Bereich der Gitterstruktur (c) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Bevorzugt handelt es sich bei der Multi-Photonen-Anregung um eine 2-Photonen-Anregung.

Mithilfe einer erfindungsgemässen optischen Struktur wird es ermöglicht, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle linienhaft, das heisst gleichzeitig längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Besonders vorteilhaft sind solche Ausführungsformen, welche linienhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von

weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen längs einer Distanz von mindestens 5 mm, gerechnet vom Ort der Einkopplung des Anregungslichts in die Schicht (a), ermöglichen.

Von besonderem Vorteil ist dabei auch, wenn, unter Einstrahlung eines aufgeweiteten Anregungslichts, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle gleichzeitig längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts mittels Multi-Photonen-Anregung angeregt werden können. Im Falle der Lichteinkopplung über ein Gitter (c) in die Schicht (a) ist dabei das Anregungslichtbündel vorzugsweise parallel zu den Gitterlinien aufgeweitet.

Es wird bevorzugt, dass eine erfindungsgemässe optische Struktur gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 1 mm<sup>2</sup>, stärker bevorzugt auf einer Fläche von mindestens 10 mm<sup>2</sup>, noch stärker bevorzugt auf einer Fläche von mindestens 1 cm<sup>2</sup> ermöglicht.

Die sehr grosse oberflächengebundene bzw. oberflächennahe Anregungsintensität, insbesondere zur Ermöglichung einer Multi-Photonen-Anregung, ist für eine Vielzahl verschiedener Anwendungen nützlich, insbesondere in der Biosensorik, wie später genauer ausgeführt, aber auch in der Nachrichten- und (Tele-)Kommunikationstechnik.

Weiterhin wird bevorzugt, dass die Struktur gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind. Insbesondere kann die Struktur so gestaltet sein, dass sie eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit optional daran anschliessenden gleichförmigen, unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfasst. Dadurch ist es, im Falle der Lumineszenzanregung durch Multi-Photonen-Anregung, auch möglich, dass eine auf oder im Nahfeld der Schicht (a) durch Multi-Photonen-Absorption erzeugte Lumineszenz

mindestens teilweise in die Schicht (a) einkoppelt und durch Leitung in der Schicht (a) zu benachbarten Bereichen auf besagter optischer Struktur geführt wird.

Für bestimmte Anwendungen ist es wünschenswert, gleichzeitig oder sequentiell Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge für dieselbe optische Struktur zu verwenden. Dann kann es von Vorteil sein, wenn diese eine Überlagerung von 2 oder mehreren Gitterstrukturen unterschiedlicher Periodizität mit zueinander paralleler oder nicht paralleler, vorzugsweise nicht paralleler Ausrichtung der Gitterlinien umfasst, welche der Einkopplung von Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge dient, wobei im Falle von 2 überlagerten Gitterstrukturen deren Gitterlinien vorzugsweise senkrecht zueinander ausgerichtet sind.

Die Höhe der Ausbreitungsverluste eines in einer optisch wellenleitenden Schicht (a) geführten Modes wird in hohem Masse von der Oberflächenrauigkeit einer darunter liegenden Trägerschicht sowie von Absorption durch möglicherweise in dieser Trägerschicht vorhandene Chromophoren bestimmt, was zusätzlich das Risiko der Anregung von für viele Anwendungen unerwünschter Lumineszenz in dieser Trägerschicht, durch Eindringen des evaneszenten Feldes des in der Schicht (a) geführten Modes, in sich birgt. Weiterhin kann es zum Auftreten thermischer Spannungen infolge unterschiedlicher thermischer Ausdehnungskoeffizienten der optisch transparenten Schichten (a) und (b) kommen. Im Falle einer chemisch empfindlichen optisch transparenten Schicht (b), sofern sie beispielsweise aus einem transparenten thermoplastischen Kunststoff besteht, ist es wünschenswert, ein Eindringen von Lösungsmitteln, welche die Schicht (b) angreifen könnten, durch eventuell in der optisch transparenten Schicht (a) vorhandene Mikroporen zu verhindern.

Im Falle eines aus mehreren Schichten ((a) und (b)) bestehenden Wellenleiters ist es daher von Vorteil, wenn sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm – 10 000 nm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet. Durch die Einführung dieser



Zwischenschicht können eine Vielzahl von Aufgaben erfüllt werden: Verringerung der Oberflächenrauigkeit unter der Schicht (a), Verminderung des Eindringens des evaneszenten Feldes von in Schicht (a) geführtem Licht in die eine oder mehrere darunter liegende Schichten, Verbesserung der Haftung der Schicht (a) auf der einen oder mehreren darunter liegenden Schichten, Verminderung von thermisch hervorgerufenen Spannungen innerhalb der Wellenleiter-Struktur, chemische Isolation der optisch transparenten Schicht (a) von darunter liegenden Schichten mittels Abdichten von Mikroporen in der Schicht (a) gegen darunter liegende Schichten.

Die Gitterstruktur (c) einer erfindungsgemässen optischen Struktur kann ein diffraktives Gitter mit einer einheitlichen Periode oder ein multidiffraktives Gitter sein. Es ist auch möglich, dass die Gitterstruktur (c) eine senkrecht oder parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelten Anregungslichts räumlich variierende Periodizität aufweist.

Es gibt zahlreiche unterschiedliche Materialien, welche für die optisch transparente Schicht (a) geeignet sind. Wesentlichste Voraussetzungen sind weitestmögliche Absorptions- und Lumineszenzfreiheit zumindest bei der Wellenlänge des eingestrahnten Anregungslichts und die Fähigkeit zur Lichtleitung zumindest über Distanzen in der Grössenordnung von Millimetern bis Zentimetern.

Für bestimmte Ausführungsformen einer erfindungsgemässen optischen Struktur wird bevorzugt, dass das Material der optisch transparenten Schicht (a) aus Glas, Quarz oder einem transparenten Kunststoff besteht, beispielsweise aus der Gruppe, welche Polycarbonat, Polyamid, Polyimid, Polymethylmethacrylat, Polypropylen, Polystyrol, Polyethylen, Polyacrylsäure, Polyacrylester, Polythioester, Polyphenylensulfid Polyethylenterephthalat (PET) und Polyurethan sowie deren Derivate umfasst.

Die optisch transparente Schicht (a) kann auch ein Material aus der Gruppe von  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{HfO}_2$ , oder  $\text{ZrO}_2$ , besonders bevorzugt aus  $\text{TiO}_2$  oder  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  oder  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ , umfassen.

Es wird weiterhin bevorzugt, dass der Brechungsindex der optisch transparenten Schicht (a) grösser als 1.8 ist

Die optisch transparente Schicht (a) kann in einer Vielzahl verschiedener „äusserer“ Ausführungsformen vorliegen. Es kann sich hierbei um einen faserförmigen oder einen planaren Wellenleiter handeln. Auch andere technisch herstellbare Geometrien sind möglich.

Die optisch transparente Schicht (a) kann selbsttragend sein, beispielsweise mit einer Dicke (oder Durchmesser im Falle faserförmiger Wellenleiter) in der Grössenordnung von Mikrometern bis Millimetern. Die Schicht (a) kann auch Bestandteil eines Mehrschichtsystems sein, mit an die Schicht (a) angrenzenden Schichten niedrigeren Brechungsindex als Schicht (a), wobei wiederum beispielsweise sowohl faserförmige als auch planare Ausführungsformen möglich sind.

Von besonderem Vorteil insbesondere ist es, wenn die optisch transparente Schicht (a) ein niedermodaler Wellenleiter ist, d.h. weniger als die ersten 10 Moden einer vorgegebenen Polarisation einer eingestrahnten Anregungswellenlänge führen kann.

Besonders bevorzugt wird, wenn die optisch transparente Schicht (a) ein niedermodaler Wellenleiter ist, welcher nur 1 - 3 Moden einer vorgegebenen Polarisation einer eingestrahnten Anregungswellenlänge führen kann.

Wie bereits vorangehend ausgeführt, werden besonders Ausführungsformen einer erfindungsgemässen optischen Struktur als (planarer) optischer Dünnschichtwellenleiter bevorzugt.

Dann wird bevorzugt, dass das Material der optisch transparenten Schicht (b) der erfindungsgemässen optischen Struktur aus Glas, Quarz oder einem transparenten thermoplastischen oder spritzbaren Kunststoff, beispielsweise aus der Gruppe besteht, die

von Polycarbonat, Polyimid, Polymethylmethacrylat, Polypropylen, Polystyrol, Polyethylen, Polyethylenterephthalat (PET) oder Polyurethan gebildet wird.

Neben dem Brechungsindex der wellenleitenden optisch transparenten Schicht (a) ist deren Dicke der zweite massgebliche Parameter zur Erzeugung eines möglichst starken evaneszenten Feldes an deren Grenzflächen zu benachbarten Schichten mit niedrigerem Brechungsindex sowie einer möglichst hohen Energiedichte innerhalb der Schicht (a). Dabei nimmt die Stärke des evaneszenten Feldes mit abnehmender Dicke der wellenleitenden Schicht (a) zu, solange die Schichtdicke ausreicht, um mindestens einen Mode der Anregungswellenlänge zu führen. Dabei ist die minimale "Cut-off"-Schichtdicke zur Führung eines Modes abhängig von der Wellenlänge dieses Modes. Sie ist für längerwelliges Licht grösser als für kurzwelliges Licht. Mit Annäherung an die "Cut-off"-Schichtdicke nehmen allerdings auch ungewünschte Ausbreitungsverluste, (insbesondere durch Streuung an Streuzentren) stark zu, was die Auswahl der bevorzugten Schichtdicke zusätzlich nach unten begrenzt. Diese Ausbreitungsverluste sind für längerwelliges Licht allerdings im allgemeinen geringer als für kurzwelliges Licht. Bevorzugt sind solche Schichtdicken der optisch transparenten Schicht (a), welche nur die Führung von 1 bis 3 Moden einer vorgegebenen Anregungswellenlänge ermöglichen, ganz besonders bevorzugt sind Schichtdicken, welche zu monomodalen Wellenleitern für diese Anregungswellenlänge führen. Dabei ist klar, dass sich der diskrete Modencharakter des geführten Lichts nur auf die transversalen Moden bezieht.

Diese Anforderungen führen dazu, dass vorteilhaft das Produkt aus der Dicke der Schicht (a) und ihrem Brechungsindex ein Zehntel bis ein Ganzes, bevorzugt ein Zehntel bis zwei Drittel, der Anregungswellenlänge eines in die Schicht (a) einzukoppelnden Anregungslichts beträgt.

Bei vorgegebenen Brechungsindices der wellenleitenden, optisch transparenten Schicht (a) und der benachbarten Schichten ist der Resonanzwinkel für die Einkopplung des Anregungslichts entsprechend der oben genannten Resonanzbedingung abhängig von der einzukoppelnden Beugungsordnung, der Anregungswellenlänge sowie der Gitterperiode.

Zum Erreichen einer hohen Einkoppeleffizienz ist die Einkopplung der ersten Beugungsordnung vorteilhaft. Neben der Höhe der Beugungsordnung ist für die Höhe der Einkoppeleffizienz die Gittertiefe massgebend. Prinzipiell vergrössert sich die Koppeleffizienz mit steigender Gittertiefe. Da der Prozess der Auskopplung völlig reziprok zur Einkopplung erfolgt, erhöht sich jedoch zugleich auch die Auskoppeleffizienz, so dass es beispielsweise zur Anregung von Lumineszenz in einem auf der Gitterstruktur (c) angeordneten oder an diese angrenzenden Messbereich (d) (gemäss nachfolgender Definition), in Abhängigkeit von der Geometrie der Messbereiche und der eingestrahlten Anregungslichtbündel, ein Optimum gibt. Aufgrund dieser Randbedingungen ist es von Vorteil, wenn das Gitter (c) eine Periode von 200 nm – 1000 nm aufweist und die Modulationstiefe des Gitters (c) 3 bis 100 nm, bevorzugt 10 bis 30 nm beträgt.

Weiterhin wird bevorzugt, dass das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,2 ist.

Dabei kann die Gitterstruktur (c) ein Reliefgitter mit Rechteck-, Dreieck- oder halbkreisförmigem Profil oder ein Phasen- oder Volumengitter mit einer periodischen Modulation des Brechungsindex in der im wesentlichen planaren optisch transparenten Schicht (a) sein.

Weiterhin kann es von Vorteil sein, wenn auf der optischen Struktur optisch oder mechanisch erkennbare Markierungen zur Erleichterung der Justierung in einem optischen System und / oder zur Verbindung mit Probenbehältnissen als Teil eines analytischen Systems aufgebracht sind.

Die erfindungsgemässe optische Struktur eignet sich insbesondere für den Einsatz in der biochemischen Analytik, zum hochempfindlichen Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer oder mehreren zugeführten Proben. Dazu werden biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente zur Erkennung und Bindung nachzuweisender Analyten auf der optischen Struktur immobilisiert. Dieses

kann grossflächig, eventuell über der gesamten Struktur, oder in diskreten sogenannten Messbereichen geschehen.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung sollen räumlich getrennte Messbereiche (d) durch die Fläche definiert werden, die dort immobilisierte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselementen zur Erkennung eines oder mehrerer Analyten aus einer flüssigen Probe einnehmen. Diese Flächen können dabei eine beliebige Geometrie, beispielsweise die Form von Punkten, Kreisen, Rechtecken, Dreiecken, Ellipsen oder Linien, haben. Es ist möglich, dass in einer 2-dimensionalen Anordnung bis zu 1 000 000 Messbereiche auf einer erfindungsgemässen optischen Struktur angeordnet sind, wobei ein einzelner Messbereich beispielsweise eine Fläche von  $0.001 \text{ mm}^2 - 6 \text{ mm}^2$  einnehmen kann. Innerhalb eines einzelnen Messbereichs können gleichartige Erkennungselemente für Erkennung und Bindung bzw. Nachweis eines einzelnen Analyten auf diesem Messbereich, oder auch unterschiedliche Erkennungselemente, zur Erkennung verschiedener Analyten, immobilisiert sein. Es können als Erkennungselemente auch solche Verbindungen verwendet werden, welche mehrere (d.h. zwei oder mehr) unterschiedliche Bereiche oder Abschnitte aufweisen, an welche unterschiedliche Analyten binden können.

Beispielsweise im Falle eines planaren optischen Dünnschichtwellenleiters mit einer oder mehreren Gitterstrukturen (c) zur Einkopplung von Anregungslicht als Wellenleiter-Struktur können die Messbereiche auf einer solchen Gitterstruktur oder auf einem gleichförmigen, unmodulierten Bereich, in Ausbreitungsrichtung des geführten Anregungslichts nachfolgend auf eine solche Gitterstruktur, angeordnet sein.

Um gleichzeitig mehrere Analyten in einer Probe nachzuweisen, kann es von Vorteil sein, zwei oder mehrere räumlich getrennte Messbereiche jeweils zu Segmenten auf der optischen Struktur zusammenzufassen. Verschiedene Segmente können durch Gitterstrukturen (c) oder durch andere auf der optischen Struktur erzeugte Unterteilungen, beispielsweise absorbierende Streifen eines aufgetragenen Pigments oder die Zwischenwände von Strukturen zur Erzeugung von Probenbehältnissen mit der

wellenleitenden Schicht (a) der optischen Struktur als Grundfläche, insbesondere optisch voneinander getrennt sein, wenn ein Übersprechen von in benachbarten Segmenten erzeugtem und in die Schicht (a) rückgekoppeltem Lumineszenzlicht verhindert werden soll. Zusätzlich können verschiedene Segmente durch eine aufgebrachte Berandung, welche zur fluidischen Abdichtung gegen Nachbarbereiche und / oder zu einer weiteren Verminderung optischen Übersprechens zwischen benachbarten Segmenten beiträgt, gegeneinander abgegrenzt werden.

Es gibt eine Vielzahl von Methoden zur Aufbringung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf die optisch transparente Schicht (a). Beispielsweise kann dieses durch physikalische Adsorption bzw. durch elektrostatische Wechselwirkung erfolgen. Die Orientierung der Erkennungselemente ist dann im allgemeinen statistisch. Ausserdem besteht die Gefahr, dass bei unterschiedlicher Zusammensetzung der den Analyten enthaltenden Probe oder der im Nachweisverfahren eingesetzten Reagentien ein Teil der immobilisierten Erkennungselemente fortgespült wird. Daher kann es von Vorteil sein, wenn zur Immobilisierung biologischer oder biochemischer oder synthetischer Erkennungselemente (e) auf der optisch transparenten Schicht (a) eine Haftvermittlungsschicht (f) aufgebracht ist. Diese Haftvermittlungsschicht sollte ebenfalls optisch transparent sein. Insbesondere sollte die Haftvermittlungsschicht nicht über die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes aus der wellenleitenden Schicht (a) in das darüber liegende Medium hinausragen. Daher sollte die Haftvermittlungsschicht (f) eine Stärke von weniger als 200 nm, vorzugsweise von weniger als 20 nm, haben. Sie kann beispielsweise chemische Verbindungen aus der Gruppe Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und "selbstorganisierte funktionalisierte Monoschichten" umfassen.

Wie in der Definition der Messbereiche festgestellt, ist es möglich, durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf der optischen Struktur räumlich getrennte Messbereiche (d) zu erzeugen. Im Kontakt mit einem lumineszenzfähigen Analyten oder eines mit dem Analyten um die Bindung an die immobilisierten Erkennungselemente konkurrierenden

lumineszenzmarkierten Analogen des Analyten oder eines weiteren lumineszenzmarkierten Bindungspartners in einem mehrstufigen Assay werden diese lumineszenzfähigen Moleküle nur selektiv in den Messbereichen an die Oberfläche der optischen Struktur binden, welche durch die Flächen definiert werden, die von den immobilisierten Erkennungselementen eingenommen werden.

Zur Aufbringung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen können eines oder mehrere Verfahren verwendet werden aus der Gruppe von Verfahren, die von "Ink jet spotting, mechanischem Spotting, micro contact printing, fluidische Kontaktierung der Messbereiche mit den biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen", gebildet werden.

Als biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselementen können beispielsweise, ohne Einschränkung der Allgemeinheit, Komponenten aus der Gruppe aufgebracht werden, die von Nukleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonukleotiden), Nukleinsäureanalogen (z. B. PNA), Antikörpern und Antikörperfragmenten, Aptameren, Peptiden und Polypeptiden, membran-gebundenen und isolierten Rezeptoren, deren Liganden, Antigenen für Antikörper, "Histidin-Tag-Komponenten", durch chemische Synthese erzeugten Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, natürlichen und künstlichen Polymeren, etc. gebildet wird.

Unter der letztgenannten Art von Erkennungselementen sind Kavitäten zu verstehen, die in einem Verfahren hergestellt werden, welches als "molecular imprinting" in der Literatur beschrieben wurde. Dazu wird, meistens in organischer Lösung, der Analyt oder ein Analogon des Analyten, in einer Polymerenstruktur eingekapselt. Man bezeichnet ihn dann als "Imprint". Dann wird der Analyt oder sein Analogon unter Zugabe geeigneter Reagentien aus der Polymerenstruktur wieder herausgelöst, so dass er dort eine leere Kavität zurücklässt. Diese leere Kavität kann dann als eine Bindungsstelle mit hoher sterischer Selektivität in einem späteren Nachweisverfahren eingesetzt werden.

Selbstverständlich eignet sich auch jede andere Verbindung als Erkennungselement, welche entsprechend der gewünschten und für die jeweilige Anwendung erforderlichen Selektivität einen nachzuweisenden Analyten erkennt und mit ihm wechselwirkt.

Es ist auch möglich, dass als biochemische oder biologische Erkennungselemente ganze Zellen oder Zellfragmente oder zelluläre Substrukturen aufgebracht werden.

Besagte Erkennungselemente können direkt auf der optischen Struktur oder vermittelt über eine Haftvermittlungsschicht, wie vorangehend beschrieben, auf der optischen Struktur aufgebracht werden.

Ausserdem ist die Funktion von „Erkennungselement“ und „Analyt“ auch in der Weise austauschbar, dass, gegebenenfalls nach einer entsprechenden chemischen Vorbehandlung, die in einer auf ihre Bestandteile zu untersuchenden Verbindungen in einer Probe auf einer erfindungsgemässen optischen Struktur immobilisiert werden und in einem nachfolgenden Schritt die entsprechenden biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente damit in Kontakt gebracht werden. Diskrete Messbereiche können dabei beispielsweise nach Aufteilung einer Probe in einzelne Aliquots durch deren anschliessende Aufbringung in diskreten Flächen auf der optischen Struktur erzeugt werden. In diesem Falle wäre typischerweise in jedem Messbereich eine Mischung verschiedener Verbindungen immobilisiert.

In vielen Fällen wird die Nachweisgrenze eines analytischen Verfahrens limitiert durch Signale sogenannter unspezifischer Bindung, d. h. durch Signale, welche durch Bindung des Analyten oder anderer zum Nachweis des Analyten eingesetzter Verbindungen erzeugt werden, welche nicht nur im Bereich der eingesetzten immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente, sondern auch in davon unbedeckten Bereichen einer optischen Struktur gebunden werden, beispielsweise durch hydrophobe Adsorption oder durch elektrostatische Wechselwirkungen. Daher ist es von Vorteil, wenn zwischen den räumlich getrennten Messbereichen (d) gegenüber dem Analyten „chemisch neutrale“ Verbindungen zur



Verminderung unspezifischer Bindung oder Adsorption aufgebracht sind. Als "chemisch neutrale" Verbindungen werden dabei solche Stoffe bezeichnet, welche selbst keine spezifischen Bindungsstellen zur Erkennung und Bindung des Analyten oder eines Analogens des Analyten oder eines weiteren Bindungspartners in einem mehrstufigen Assay aufweisen und durch ihre Anwesenheit den Zugang des Analyten oder seines Analogens oder der weiteren Bindungspartner zur Oberfläche der optischen Struktur blockieren.

Als "chemisch neutrale" Verbindungen können beispielsweise Stoffe aus den Gruppen eingesetzt werden, die von Albuminen, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierender, fragmentierter natürlicher oder synthetischer DNA, wie beispielsweise von Herings- oder Lachssperma, oder auch ungeladenen, aber hydrophilen Polymeren, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, gebildet werden.

Insbesondere die Auswahl der genannten Stoffe zur Verminderung unspezifischer Hybridisierung in Polynukleotid-Hybridisierungsassays (wie Herings- oder Lachssperma) wird dabei durch die empirische Bevorzugung von für die zu analysierenden Polynukleotide möglichst weitgehend verschiedener DNA bestimmt, über die keine Wechselwirkungen mit den nachzuweisenden Polynukleotidsequenzen bekannt ist.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein optisches System zur Multi-Photonen-Anregung, umfassend mindestens eine Anregungslichtquelle und eine erfindungsgemäße optische Struktur, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Eine Gruppe von Ausführungsformen eines erfindungsgemässen optischen Systems ist dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in

einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) der optischen Struktur durch Multi-Photonen-Anregung angeregten Moleküle um photoreaktive, d.h. nach Lichtanregung chemisch reaktive Moleküle oder molekulare Gruppen handelt. Dabei besteht eine Variante darin, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photopolymerisation ausgelöst wird. Als photoreaktive Moleküle eignen sich hierfür beispielsweise Verbindungen mit photolabilen Schutzgruppen.

Kennzeichen einer anderen Variante ist, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photodissoziation, d.h. Aufspaltung eines bis zu der Multi-Photonen-Anregung bestehenden Moleküls oder molekularen Komplexes auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zu der Schicht (a) ausgelöst wird. Hierbei können besagte photoreaktive Moleküle oder Molekülgruppen beispielsweise sogenannte photolabile Crosslinker sein.

Eine besondere Variante besteht dabei darin, dass besagte photoreaktive Moleküle Bestandteil einer Molekülmatrix zur Einbettung von Molekülen höheren Molekulargewichts, insbesondere von natürlichen und künstlichen Polymeren bzw. von biologischen Molekülen wie Proteinen, Polypeptiden und Nukleinsäuren, sind. Besonders bevorzugt ist dabei eine solche Ausführungsform, welche darin besteht, dass es sich bei der optischen Struktur um einen Probenträger für die Massenspektrometrie, vorzugsweise für MALDI/TOF-MS (matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry) handelt.

Bevorzugt ist ein optisches System zur Multi-Photonen-Anregung, umfassend mindestens eine Anregungslichtquelle und eine erfindungsgemäße optische Struktur, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a)

oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.

Das erfindungsgemässe optische System ist typischerweise so gestaltet, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über ein oder mehrere optische Einkoppelemente aus der Gruppe erfolgt, die von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der wellenleitenden Schicht angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern gebildet wird.

Es wird bevorzugt, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) erfolgt.

Ausserdem wird bevorzugt, dass es sich bei der optischen Struktur um eine planare Dünnschicht-Wellenleiter-Struktur handelt.

Besonders bevorzugt wird eine solche Ausführungsform eines erfindungsgemässen optischen Systems, umfassend mindestens eine Anregungslichtquelle und eine optische Struktur nach einer der vorgenannten Ausführungsformen, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass die Intensität eines unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) auf eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) der optischen Struktur eingestrahlten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) zumindest im Bereich der Gitterstruktur (c) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Bevorzugt handelt es sich bei der Multi-Photonen-Anregung um eine 2-Photonen-Anregung.

Bevorzugt werden solche Ausführungsformen, welche es ermöglichen, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle linienhaft, das heisst gleichzeitig längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Besonders vorteilhaft sind dabei solche Ausführungsformen, welche linienhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen längs einer Distanz von mindestens 5 mm, gerechnet vom Ort der Einkopplung des Anregungslichts in die Schicht (a), ermöglichen.

Ausserdem wird bevorzugt, dass, unter Einstrahlung eines aufgeweiteten Anregungslichts, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle gleichzeitig flächenhaft längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts mittels Multi-Photonen-Anregung angeregt werden können. Sofern die Lichteinkopplung in die Schicht (a) über eine darin modulierte Gitterstruktur (c) erfolgt, ist dabei das Anregungslichtbündel vorteilhaft parallel zu den Gitterlinien aufgeweitet.

Von besonderem Vorteil sind auch solche Ausführungsformen eines erfindungsgemässen optischen Systems, mit denen gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens  $1 \text{ mm}^2$ , stärker bevorzugt auf einer Fläche von mindestens  $10 \text{ mm}^2$ , noch stärker bevorzugt auf einer Fläche von mindestens  $1 \text{ cm}^2$  möglich ist.

Ebenfalls bevorzugte Ausführungsformen eines erfindungsgemässen optischen Systems sind dadurch gekennzeichnet, dass die optische Struktur, als Teil dieses Systems, gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind. Wiederum ist auch für viele

Anwendungen vorteilhaft, wenn die optische Struktur eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit optional daran anschliessenden gleichförmigen, unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfasst.

Ein wesentliches Kennzeichen zahlreicher Ausführungsformen eines erfindungsgemässen optischen Systems zur Lumineszenzanregung ist auch, dass eine auf oder im Nahfeld der Schicht (a) der optischen Struktur durch Multi-Photonen-Absorption erzeugte Lumineszenz mindestens teilweise in die Schicht (a) einkoppelt und durch Leitung in der Schicht (a) zu benachbarten Bereichen auf besagter optischer Struktur geführt wird.

Typischerweise umfasst ein erfindungsgemässes optisches System zusätzlich mindestens einen Detektor zur Erfassung einer oder mehrerer Lumineszenzen von der optischen Struktur.

Für die Geometrie der Strahlführung des Anregungslichts bis zum Auftreffen auf der erfindungsgemässen optischen Struktur gibt es eine Vielzahl möglicher verschiedener Ausführungsformen. Eine der bevorzugten Ausführungen ist dadurch gekennzeichnet, dass das von der mindestens einen Anregungslichtquelle ausgesandte Anregungslicht im wesentlichen parallel ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von mindestens einer Lichtquelle mit einer Aufweitungsoptik zu einem im wesentlichen parallelen Strahlenbündel aufgeweitet wird und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine grossflächige in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von der mindestens einen Lichtquelle durch ein oder, im Falle mehrerer

Lichtquellen, gegebenenfalls mehrere diffraktive optische Elemente, vorzugsweise Dammann-Gitter, oder refraktive optische Elemente, vorzugsweise Mikrolinsen-Arrays, in eine Vielzahl von Einzelstrahlen möglichst gleicher Intensität der von einer gemeinsamen Lichtquelle stammenden Teilstrahlen zerlegt wird, welche jeweils im wesentlichen parallel zueinander auf Gitterstrukturen (c) unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahlt werden.

Für bestimmte Anwendungen wird bevorzugt, dass als Anregungslichtquellen zwei oder mehrere Lichtquellen mit gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

Für solche Anwendungen, in denen zwei oder mehr unterschiedliche Anregungswellenlängen eingesetzt werden sollen, wird eine solche Ausführungsform des optischen System bevorzugt, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass das Anregungslicht von 2 oder mehr Lichtquellen gleichzeitig oder sequentiell aus verschiedenen Richtungen auf eine Gitterstruktur (c) eingestrahlt und über diese in die Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelt wird, welche eine Überlagerung von Gitterstrukturen mit unterschiedlicher Periodizität umfasst.

Es wird bevorzugt, dass zur Detektion mindestens ein ortsauflösender Detektor verwendet wird, beispielsweise aus der Gruppe, die von CCD-Kameras, CCD-Chips, Photodioden-Arrays, Avalanche-Dioden-Arrays, Multichannelplates und Vielkanal-Photomultipliern gebildet wird.

Gemäss dieser Erfindung umfasst das optische System solche Ausführungsformen, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass zwischen der einen oder mehreren Anregungslichtquellen und der erfindungsgemässen optischen Struktur und /oder zwischen besagter optischer Struktur und dem einen oder mehreren Detektoren optische Komponenten aus der Gruppe verwendet werden, die von Linsen oder Linsensystemen zur Formgestaltung der übertragenen Lichtbündel, planaren oder gekrümmten Spiegeln zur Umlenkung und gegebenenfalls zusätzlich zur Formgestaltung von Lichtbündeln,

Prismen zur Umlenkung und gegebenenfalls zur spektralen Aufteilung von Lichtbündeln, dichroischen Spiegeln zur spektral selektiven Umlenkung von Teilen von Lichtbündeln, Neutralfiltern zur Regelung der übertragenen Lichtintensität, optischen Filtern oder Monochromatoren zur spektral selektiven Übertragung von Teilen von Lichtbündeln oder polarisationsselektiven Elementen zur Auswahl diskreter Polarisationsrichtungen des Anregungs- und / oder Lumineszenzlichts gebildet werden.

Es ist möglich, dass die Einstrahlung des Anregungslichts in Pulsen mit einer Dauer zwischen 1 fsec und 10 Minuten erfolgt und gegebenenfalls das Emissionslicht aus den Messbereichen zeitlich aufgelöst gemessen wird. Dabei kann, unter Einsatz von Detektoren geeigneter zeitlicher Auflösung, die Messung des Emissionslichts aus den Messbereichen korreliert mit der gepulsten Einstrahlung des Anregungslichts erfolgen. Während in den bekannten Anordnungen zur 2-Photonen-Fluoreszenzanregung im typischerweise beugungsbegrenzten Fokusbereich des Anregungs-Lasers in hoher Pulsfolge betriebene Femtosekunden-Pulslaser Verwendung fanden, ist das erfindungsgemässe optische System mit einer erfindungsgemässen optischen Struktur dadurch gekennzeichnet, dass auch Laser längerer Pulsdauer (z. B. Pikosekunden- oder sogar Nanosekunden-Laser) bei gegebenenfalls auch niedrigerer Pulsfrequenz als Anregungslichtquelle zur Multi-Photonen-Lumineszenzanregung (vorzugsweise 2-Photonen-Anregung) verwendet werden können.

Bei Verwendung sehr kurzpulsiger Laser ist die Abhängigkeit der spektralen Bandbreite des Anregungspulses von der Pulslänge (als Folge der Unschärferelation) zu beachten, um die Einkopplung des Anregungslichts eines solchen Laser in eine erfindungsgemässe optische Struktur auf maximale Einkoppleffizienz zu optimieren. Beispielsweise kann typischerweise ein 100 fs-Laser eine Bandbreite in der Grössenordnung von 5 – 15 nm haben. Bezogen auf eine erreichbare Einkoppleffizienz in eine Wellenleiter-Struktur über ein Koppelgitter (c) bedeutet dieses, dass – im Falle flacher Gitter von beispielsweise  $< 10$  nm – bei einem eingestellten Winkel nur für einen kleinen Anteil des eingestrahnten Spektrums die Resonanzbedingung zur Einkopplung erfüllt ist und damit die Effizienz der Einkopplung gering ist. Durch die Verwendung tieferer Gitter kann die

Schärfe der Resonanzbedingung, sowohl hinsichtlich der Winkel- als auch der Spektralakzeptanz, verringert werden. Als Grundregel bedeutet dieses, dass bei Laserpuls dauern von weniger als ca. 1 – 10 psec (in Abhängigkeit von den übrigen Systemparametern) dieser Zusammenhang bei der Optimierung der Gitterparameter berücksichtigt werden muss, wobei tendenziell zur effizienten Einkopplung von Licht mit kürzeren Puls dauern grössere Gittertiefen erforderlich sind.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen eines erfindungsgemässen optischen Systems zeichnen sich dadurch aus, dass zur Referenzierung Lichtsignale aus der Gruppe gemessen werden, die von Anregungslicht am Ort der Lichtquellen oder nach ihrer Aufweitung oder nach ihrer Unterteilung in Teilstrahlen, Streulicht bei der Anregungswellenlänge aus dem Bereich der einen oder mehreren räumlich getrennten Messbereiche, und über die Gitterstruktur (c) neben den Messbereichen ausgekoppeltem Licht der Anregungswellenlänge gebildet werden. Insbesondere ist dabei von Vorteil, wenn die Messbereiche zur Bestimmung des Emissionslichts und des Referenzsignals identisch sind.

Es ist möglich, dass die Einstrahlung des Anregungslichts auf und Detektion des Emissionslichts von einem oder mehreren Messbereichen sequentiell für einzelne oder mehrere Messbereiche erfolgt. Dieses kann insbesondere dadurch realisiert werden, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung beweglicher optischer Komponenten erfolgt, die aus der Gruppe von Spiegeln, Umlenkprismen und dichroischen Spiegeln gebildet wird.

Bestandteil der Erfindung ist auch ein solches optisches System, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung eines im wesentlichen winkel- und fokusgetreuen Scanners erfolgt. Ausserdem ist es möglich, dass die optische Struktur zwischen Schritten der sequentiellen Anregung und Detektion bewegt wird.



Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein analytisches System zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten, mittels Multi-Photonen-Anregung des Analyten oder eines seiner Bindungspartner oder der die Analytmoleküle umgebenden Moleküle einer Probenmatrix, in mindestens einer Probe auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer optischen Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter, mit

- einer erfindungsgemässen optischen Struktur nach einer der genannten Ausführungsformen und
- einem erfindungsgemässen optischen System nach einer der vorgenannten Ausführungsformen.

Vorzugsweise handelt es sich bei besagtem optischem Wellenleiter wiederum um einen optischen Dünnschichtwellenleiter.

Eine spezielle Ausführungsform eines solchen erfindungsgemässen analytischen Systems ist dadurch gekennzeichnet, dass es sich hierbei um ein massenspektrometrisches Messsystem, vorzugsweise MALDI/TOF-MS (matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry), und bei besagter optischer Struktur um einen Probenträger für die Massenspektrometrie handelt, wobei die nachzuweisenden Analytmoleküle, vorzugsweise Moleküle höheren Molekulargewichts, insbesondere natürliche und künstliche Polymeren bzw. biologische Moleküle wie Proteine, Polypeptide und Nukleinsäuren, eingebettet sind in eine Matrix photoreaktiver Moleküle, aus der sie mittels Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle dissoziiert bzw. desorbiert werden können.

Eine andere Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photopolymerisation ausgelöst wird.

Kennzeichen einer weiteren Variante ist, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger

als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photodissoziation, d.h. Aufspaltung eines bis zu der Multi-Photonen-Anregung bestehenden Moleküls oder molekularen Komplexes auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zu der Schicht (a) ausgelöst wird.

Bevorzugt wird ein analytisches System zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten, mittels Multi-Photonen-Anregung des Analyten oder eines seiner Bindungspartner, in mindestens einer Probe auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer optischen Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter (vorzugsweise ausgebildet als Dünnschichtwellenleiter), mit

- einer erfindungsgemässen optischen Struktur
- einem erfindungsgemässen optischen System sowie
- Zuführungsmitteln, um die eine oder mehrere Proben mit den Messbereichen auf der optischen Struktur in Kontakt zu bringen.

Dabei wird bevorzugt, dass das analytische System zusätzlich eine oder mehrere Probenbehältnisse umfasst, welche mindestens im Bereich der einen oder mehreren Messbereiche oder der zu Segmenten zusammengefassten Messbereiche zur optischen Struktur hin geöffnet sind, wobei die Probenbehältnisse vorzugsweise jeweils ein Volumen von 0.1 nl – 100 µl haben.

Eine mögliche Ausführungsform besteht darin, dass die Probenbehältnisse auf der von der optisch transparenten Schicht (a) abgewandten Seite, mit Ausnahme von Ein- und / oder Auslassöffnungen für die Zufuhr oder den Auslass der Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien, geschlossen sind und die Zufuhr oder der Auslass von Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien in einem geschlossenen Durchflusssystem erfolgen, wobei im Falle der Flüssigkeitszufuhr zu mehreren Messbereichen oder Segmenten mit gemeinsamen Einlass- und Auslassöffnungen diese bevorzugt spalten- oder zeilenweise adressiert werden.

Eine andere mögliche Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse auf der von der optisch transparenten Schicht (a) abgewandten Seite Öffnungen zur lokal adressierten Zugabe oder Entfernung der Proben oder anderer Reagentien besitzen.

Eine Weiterentwicklung des erfindungsgemässen analytischen Systems ist so gestaltet, dass Behältnisse für Reagentien vorgesehen sind, welche während des Verfahrens zum Nachweis des einen oder mehrerer Analyten benetzt und mit den Messbereichen in Kontakt gebracht werden

Insbesondere für („High-Through-Put“-) Screening-Applikationen, beispielsweise zur Auswahl bindungsfähiger Substanz für eine sogenannte Zielverbindung („Target“) und deren Anreicherung in nachfolgenden Verfahrensschritten, geeignet ist ein erfindungsgemässes analytisches System zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten, mittels Lumineszenzanregung des Analyten oder eines seiner Bindungspartner, in mindestens einer Probe auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer optischen Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter (vorzugsweise einen Dünnschichtwellenleiter), mit

- einer erfindungsgemässen optischen Struktur
- einem erfindungsgemässen optischen System
- Zuführungsmitteln, um die eine oder mehrere Proben mit den Messbereichen auf der optischen Struktur in Kontakt zu bringen
- einem oder mehreren Probenbehältnissen zur Aufnahme der einen oder mehreren Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien sowie
- Mitteln zur Entfernung der in den Probenbehältnissen enthaltenen Flüssigkeit,

dadurch gekennzeichnet, dass nach dem Nachweis der Bindung eines oder mehrerer Analyten in einem oder mehreren Messbereichen der von diesem Analyten mit dem betreffenden immobilisierten Erkennungselement und gegebenenfalls weiteren Bindungspartnern gebildete Molekülkomplex mittels Photodissoziation nach Multi-Photonen-Anregung aufgespalten oder von der optischen Struktur abgespalten werden kann und besagter Molekülkomplex als ganzer oder in Teilen, nach Elution aus dem

betreffenden Probenbehältnis, einer weiteren analytischen oder präparativen Behandlung zugeführt werden kann.

Bevorzugt wird dabei eine solche Ausführungsform eines erfindungsgemässen analytischen Systems, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass diese eine Auftrennung verschiedener auf besagter optischer Struktur gebundener Molekülkomplexe mit in einer oder mehreren zugeführten Proben nachgewiesenen Analyten, oder von Teilen dieser Molekülkomplexe, nach der Höhe des Absorptionsquerschnitts dieser Molekülkomplexe für eine Photodissoziation mittels Multi-Photonen-Anregung ermöglicht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Multi-Photonen-Anregung, unter Verwendung einer erfindungsgemässen optischen Struktur und / oder eines erfindungsgemässen optischen Systems und / oder eines erfindungsgemässen analytischen Systems, jeweils nach einer der vorgenannten Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Eine Gruppe von Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) der optischen Struktur befindliche Moleküle photoreaktiv sind und durch Multi-Photonen-Anregung zu einer chemischen Reaktion angeregt werden.

Dabei besteht eine Variante darin, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) der optischen Struktur befindliche Moleküle durch Multi-Photonen-Anregung zu einer Bindung mit anderen Molekülen angeregt werden. Kennzeichen einer speziellen Ausführungsform ist dabei, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a)

der optischen Struktur befindliche Moleküle durch Multi-Photonen-Anregung zu einer Photopolymerisation angeregt werden.

Kennzeichen einer anderen Variante des Verfahrens ist, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photodissoziation, d.h. Aufspaltung eines bis zu der Multi-Photonen-Anregung bestehenden Moleküls oder molekularen Komplexes auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zu der Schicht (a) ausgelöst wird.

Eine spezielle Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagtem analytischen System um ein massenspektrometrisches Messsystem, vorzugsweise MALDI/TOF-MS (matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry), und bei besagter optischen Struktur um einen Probenträger für die Massenspektrometrie handelt, wobei die nachzuweisenden Analytmoleküle, vorzugsweise Moleküle höheren Molekulargewichts, insbesondere natürliche und künstliche Polymeren bzw. biologische Moleküle wie Proteine, Polypeptide und Nukleinsäuren, eingebettet sind in eine Matrix photoreaktiver Moleküle, aus der sie mittels Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle dissoziiert bzw. desorbiert werden können.

Eine bevorzugte Ausführungsform ist ein Verfahren zur Lumineszenzanregung, unter Verwendung einer erfindungsgemässen optischen Struktur und / oder eines erfindungsgemässen optischen und / oder eines erfindungsgemässen analytischen Systems, jeweils nach einer der vorgenannten Ausführungsformen, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.

Besonders bevorzugt wird ein Verfahren zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten in einer oder mehreren Proben auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer erfindungsgemässen optischen Struktur nach einem der entsprechenden Ausführungsformen zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von einem Messbereich oder von einem Array aus mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, auf besagter optischer Struktur, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um ein auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliches Molekül mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.

In dem erfindungsgemässen Verfahren kann die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über ein oder mehrere optische Einkoppelemente aus der Gruppe erfolgen, die von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der wellenleitenden Schicht angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern gebildet wird.

Es wird bevorzugt, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) erfolgt.

Vorzugsweise handelt es sich bei der optischen Struktur um eine planare Dünnschicht-Wellenleiter-Struktur.

Besonders bevorzugt wird ein Verfahren mit einer optischen Struktur umfassend einen planaren Dünnschicht-Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in Schicht (a) modulierten

Gitterstruktur (c), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahltten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) zumindest im Bereich der Gitterstruktur (c) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

Es wird bevorzugt, dass es sich bei der Multi-Photonen-Anregung um eine 2-Photonen-Anregung handelt.

Vorteilhaft sind solche Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) der optischen Struktur oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle linienhaft, das heisst gleichzeitig längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, mittels Multi-Photonen-Anregung angeregt werden können.

Besonders vorteilhaft sind dabei solche Ausführungsformen, welche linienhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen längs einer Distanz von mindestens 5 mm, gerechnet vom Ort der Einkopplung des Anregungslichts in die Schicht (a), ermöglichen.

Ausserdem wird bevorzugt, dass, unter Einstrahlung eines aufgeweiteten Anregungslichts, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle gleichzeitig flächenhaft längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts mittels Multi-Photonen-Anregung angeregt werden können. Dabei ist das Anregungslichtbündel im Falle der Lichteinkopplung in die Schicht (a) über eine darin modulierte Gitterstruktur (c) vorzugsweise wiederum parallel zu den Gitterlinien aufgeweitet.

Von besonderem Vorteil sind auch solche Ausführungsformen eines erfindungsgemässen Verfahrens, mit denen gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 1 mm<sup>2</sup>, stärker bevorzugt auf einer Fläche von mindestens 10 mm<sup>2</sup>, noch stärker bevorzugt auf einer Fläche von mindestens 1 cm<sup>2</sup> möglich ist.

Dafür kann es für verschiedene Ausführungsformen des erfindungsgemässen Verfahrens vorteilhaft sein, wenn die optische Struktur, als Teil des optischen Systems, gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind. Insbesondere kann es vorteilhaft sein, wenn die optische Struktur eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit gegebenenfalls daran anschliessenden gleichförmigen, unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfasst. In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens ist das optische System dabei so gestaltet, dass eine auf oder im Nahfeld der Schicht (a) der optischen Struktur durch Multi-Photonen-Absorption erzeugte Lumineszenz mindestens teilweise in die Schicht (a) einkoppelt und durch Leitung in der Schicht (a) zu benachbarten Bereichen auf besagter optischer Struktur geführt wird.

Bei den vorgenannten Verfahren zur Lumineszenzdetektion ist es möglich, dass (1) die isotrop abgestrahlte Lumineszenz oder (2) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelte und über Gitterstrukturen (c) ausgekoppelte Lumineszenz oder Lumineszenzen beider Anteile (1) und (2) gleichzeitig gemessen werden.

In dem erfindungsgemässen Verfahren kann zur Erzeugung der Lumineszenz oder Fluoreszenz ein Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabel verwendet werden, das bei einer Wellenlänge zwischen 200 nm und 1100 nm angeregt werden kann.



Bei den Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabeln kann es sich um herkömmliche Lumineszenz- oder Fluoreszenzfarbstoffe oder auch um sogenannte lumineszente oder fluoreszente Nanopartikel, basierend auf Halbleitern (W. C. W. Chan und S. Nie, "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection", *Science* 281 (1998) 2016 – 2018) handeln. Selbstverständlich eignen sich solche Lumineszenzlabel am besten, welche bei der eingesetzten Anregungswellenlänge einen besonders grossen Multi-Photonen-Absorptionsquerschnitt, im Falle der bevorzugten 2-Photonen-Anregung einen besonders grossen 2-Photonen-Absorptionsquerschnitt, und dabei zugleich eine möglichst hohe Photostabilität aufweisen.

Es wird bevorzugt, dass besagtes Lumineszenzlabel mittels 2-Photonen-Absorption angeregt wird. Insbesondere wird dabei bevorzugt, dass besagtes Lumineszenzlabel durch 2-Photonen-Absorption eines Anregungslichts im Sichtbaren oder nahen Infraroten zu einer ultravioioletten oder blauen Lumineszenz angeregt wird.

Das Lumineszenzlabel kann an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen oder an die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen gebunden sein.

Zusätzlich können ein zweites oder noch weitere Lumineszenzlabel mit gleicher oder unterschiedlicher Anregungswellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden. Hierbei kann es vorteilhaft sein, wenn das zweite oder noch weitere Lumineszenzlabel bei der gleichen Wellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel angeregt werden können, aber bei anderen Wellenlängen emittieren.

Für andere Applikationen ist es vorteilhaft, wenn die Anregungsspektren und Emissionsspektren der eingesetzten Lumineszenzlabel nur wenig oder gar nicht überlappen.

In dem erfindungsgemässen Verfahren kann es weiterhin vorteilhaft sein, wenn zum Nachweis des Analyten Ladungs- oder optischer Energietransfer von einem als Donor dienenden ersten Lumineszenzlabel zu einem als Akzeptor dienenden zweiten Lumineszenzlabel verwendet wird.

Eine besondere Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten beruht darauf, dass die Eigenfluoreszenz („Autofluoreszenz“) fluoreszenzfähiger Biomoleküle, wie beispielsweise von Proteinen mit fluoreszenzfähigen Aminosäuren wie z. B. Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin, welche sich auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befinden, durch Multi-Photonen-Absorption (vorzugsweise 2-Photonen-Absorption) angeregt werden kann. Unter dieser Gruppe bevorzugt ist Tryptophan mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von ca. 5600 ( $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bei 280 nm und einer Quantenausbeute der Emission, um 360 nm, von 20 %. Typischerweise ist daher eine Anregung der Tryptophan-Fluoreszenz in einem klassischen Ein-Photonen-Absorptionsprozess im evaneszenten Feld eines hochbrechenden Wellenleiters nicht möglich, da Anregungslicht einer so kurzen Wellenlänge im Wellenleiter nicht über signifikante Entfernungen geführt, sondern absorbiert oder ausgestreut wird. Oft ist es auch nicht möglich, derart kurzwelliges Anregungslicht an den Wellenleiter heranzuführen, beispielsweise dann nicht, wenn zuvor ein bei dieser Wellenlänge absorbierendes Material (wie beispielsweise die meisten Kunststoffe) durchstrahlt werden muss. Dem erfindungsgemässen Verfahren folgend, ist es jedoch möglich, für einen Multi-Photonen-Absorptionsprozess Anregungslicht geeigneter längerer Wellenlänge zu verwenden, welches in der wellenleitenden Schicht (a) über längere Strecken geführt wird, und damit die kurzwellige Fluoreszenz anzuregen. Ein besonderer Vorteil dieser Variante des Verfahrens ist, dass sich damit die chemische Verknüpfung des Analyten, oder eines seiner Bindungspartner in einem Nachweisverfahren, mit einem Lumineszenzlabel erübrigt. Stattdessen kann der Nachweis direkt auf der Detektion lumineszenzfähiger biologischer Verbindungen beruhen, welche als natürlicher Bestandteil dieser Verbindungen vorliegen oder, z. B.

durch Punktmutationen einzelner Aminosäuren in einem biologischen Erzeugungsprozess in den Analyten oder einen seiner Bindungspartner eingebaut werden.

Für diese besondere Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens gibt es wiederum zahlreiche mögliche Untervarianten. Beispielsweise können die zum Analytnachweis immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente so ausgewählt sein, dass sie keine oder nur möglichst geringe Eigenlumineszenz durch Multi-Photonen-Anregung aufweisen (unter den jeweiligen Versuchsbedingungen). Damit ist es möglich, ein möglichst niedriges Hintergrundsignal beim Schritt des Analytnachweises durch eine Lumineszenzanregung mittels Multiphotonen-Absorption des Analyten selbst oder eines der im Nachweisverfahren eingesetzten Bindungspartner zu erhalten. Eine andere vorteilhafte Ausführungsform beruht darauf, mithilfe einer in einem Multi-Photonen-Absorptionsprozess angeregten Eigenlumineszenz (Eigen- oder Auto-Fluoreszenz) der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente deren Immobilisierungsdichte in den Messbereichen zu bestimmen. Damit ist es möglich, das im Analytnachweisschritt (durch Multi-Photonen-Absorption oder auch Ein-Photonen-Absorption) angeregte Lumineszenzsignal des Analyten oder eines seiner Bindungspartner bezüglich der Anzahl oder Dichte der verfügbaren Bindungsstellen zu korrigieren bzw. zu normieren.

Insbesondere kann bei geeigneten Absorptionsspektren der Analyten bzw. derer Bindungspartner sowie der immobilisierten Erkennungselemente für die Ein- bzw. Multi-Photonen-Absorption ein- und derselbe Laser zur (gleichzeitigen oder sequentiellen) Ein-Photonen-Anregung und einer Multi-Photonen-Anregung von Lumineszenz eingesetzt werden, wobei im Falle einer sequentiellen solchen Anregung deren bevorzugte Reihenfolge in Abhängigkeit von der jeweiligen Applikation unterschiedlich sein kann.

Bei sehr hoher Energiedichte an der Oberfläche der Schicht (a) und unter Bereitstellung von Luminophoren mit geeigneten Absorptionsquerschnitten ist es vorstellbar, dass eine Lumineszenzanregung gleichzeitig bei bis zu drei verschiedenen Wellenlängen stattfindet, beispielsweise mit einem Laser mit 1064 nm Emissionswellenlänge Anregung

eines NIR-Farbstoffs durch Ein-Photonen-Absorption, Anregung eines Farbstoffs im Sichtbaren (etwa 532 nm) durch Zwei-Photonen-Absorption und eines UV-Farbstoffs durch Drei-Photonen-Absorption (bei etwa 355 nm). Entsprechende Wellenlängen bei Einsatz eines Lasers mit Emission bei 780 nm wären 390 nm für die Zwei-Photonen-Absorption und 260 nm für die Drei-Photonen-Absorption.

Das erfindungsgemässe Verfahren der Multi-Photonen-Anregung kann also mit einem gleichzeitigen oder entsprechend sequentiell durchzuführenden Lumineszenznachweis der Emission von lumineszenzfähigen Molekülen, welche in einem Ein-Photonen-Absorptionsprozess bei der eingestrahlten Anregungswellenlänge angeregt werden können, kombiniert werden.

Zusätzlich kann es von Vorteil sein, wenn die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden. Weiterhin erlaubt das Verfahren die Möglichkeit, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisation als der des Anregungslichts gemessen werden.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens mit einem analytischen System zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten, mittels Lumineszenzanregung des Analyten oder eines seiner Bindungspartner (nach Ein- oder Multi-Photonen-Anregung), in mindestens einer Probe auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer optischen Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter (vorzugsweise einen Dünnschichtwellenleiter), mit

- einer erfindungsgemässen optischen Struktur
- einem erfindungsgemässen optischen System
- Zuführungsmitteln, um die eine oder mehrere Proben mit den Messbereichen auf der optischen Struktur in Kontakt zu bringen
- einem oder mehreren Probenbehältnissen zur Aufnahme der einen oder mehreren Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien sowie
- Mitteln zur Entfernung der in den Probenbehältnissen enthaltenen Flüssigkeit,

dadurch gekennzeichnet, dass nach dem Nachweis der Bindung eines oder mehrerer Analyten in einem oder mehreren Messbereichen der von diesem Analyten mit dem betreffenden immobilisierten Erkennungselement und gegebenenfalls weiteren Bindungspartnern gebildete Molekülkomplex mittels Photodissoziation nach Multi-Photonen-Anregung aufgespalten oder von der optischen Struktur abgespalten werden kann und besagter Molekülkomplex als ganzer oder in Teilen, nach Elution aus dem betreffenden Probenbehälter, einer weiteren analytischen oder präparativen Behandlung zugeführt werden kann.

Eine spezielle Variante des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass während der Multi-Photonen-Anregung von an der Oberfläche der Schicht (a) oder innerhalb eines Abstandes von weniger als 200 nm von der Schicht (a) befindliche Moleküle innerhalb dieses Abstandes gefangen gehalten werden, indem die oberflächennahe hohe Anregungsintensität und deren ansteigender Gradient in Richtung der Oberfläche auf diese Moleküle den Effekt einer „optischen Pinzette“ („optical tweezers“) ausübt.

Das erfindungsgemässe Verfahren nach einer der voranstehenden Ausführungsformen ermöglicht eine gleichzeitige und / oder sequentielle, quantitative und / oder qualitative Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren oder „Histidin-Tag-Komponenten“, Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.

Die zu untersuchenden Proben können natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Eigelb sein.

Eine zu untersuchende Probe kann aber auch eine optisch trübe Flüssigkeit, Oberflächenwasser, ein Boden- oder Pflanzenextrakt, eine Bio- oder Syntheseprozessbrühe sein.

Die zu untersuchenden Proben können auch aus biologischen Gewebeteilen entnommen sein.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemässen optischen Struktur und / oder eines erfindungsgemässen optischen Systems und / oder eines erfindungsgemässen analytischen Systems und / oder eines erfindungsgemässen Verfahrens, jeweils nach einer der vorgenannten Ausführungsformen, zu quantitativen und / oder qualitativen Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätsscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Expressionsprofilen sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktentwicklung und Forschung, der Human- und Veterinärmedizin, der Agrochemischen Produktentwicklung und Forschung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen und Bakterien, in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

Weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemässen optischen Struktur und / oder eines erfindungsgemässen optischen Systems und / oder eines erfindungsgemässen Verfahrens in der nichtlinearen Optik oder in der Telekommunikation oder der Nachrichtentechnik.

Ganz allgemein eignen sich eine erfindungsgemässe optische Struktur und / oder ein erfindungsgemässes optisches System und / oder ein erfindungsgemässes analytisches System und / oder ein erfindungsgemässes Verfahren ausserdem für

oberflächengebundene Untersuchungen, welche den Einsatz sehr hoher Anregungslichtintensitäten und / oder Anregungsdauern erfordern, wie beispielsweise Studien zur Photostabilität von Materialien, photokatalytische Prozesse etc.

Mit dem nachfolgenden Ausführungsbeispiel soll die Erfindung genauer erläutert und demonstriert werden, ohne dass durch die dargestellten spezifischen Ausführungsformen die Allgemeinheit der Erfindung eingeschränkt werden soll.

Es zeigen

Fig. 1 eine Kamera-Aufnahme einer mit bloßem Auge sichtbaren, mithilfe einer erfindungsgemässen optischen Struktur erzeugten Fluoreszenz nach 2-Photonen-Anregung;

Fig. 2 und Fig. 3 Querschnittsprofile der durch 2-Photonen-Anregung erzeugten Fluoreszenz, nach Anregung durch unterschiedlich stark kollimierte Anregungslichtstrahlen;

Fig. 4 das Querschnittsprofil der durch 2-Photonen-Anregung erzeugten Fluoreszenz, nach Anregung durch den parallel zu den Gitterlinien der optischen Struktur aufgeweiteten Anregungslichtstrahl;

Fig. 5 die quadratische Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzintensität von der Anregungslichtintensität.

**Beispiel 1:****1. Optische Struktur zur 2-Photonen-Anregung**

Die optische Struktur besteht aus einem Glassubstrat (AF45-Glas als optische Schicht (b),  $n = 1.496$  bei 800 nm) mit einer darauf aufgetragenen 150 nm dünnen Schicht (b) aus Tantalpentoxid (wellenleitende Schicht (a),  $n = 2.092$  bei 800 nm). Zur Ein- und Auskopplung von Licht in bzw. aus der wellenleitenden Schicht (a) dienen im Abstand von 9 nm in der Schicht (a) erzeugte Koppelgitter in der Form von Reliefgittern (Gitterperiode 360 nm, Gittertiefe 12 nm). Unter diesen Bedingungen beträgt der Einkoppelwinkel vom Glassubstrat (optische Schicht (b),  $n = 1.496$  bei 810 nm) zur wellenleitenden Schicht (a)  $-20.4^\circ$ ; der äussere Einstrahlwinkel auf die Schicht (b) (gemessen zur Normalen der optischen Struktur) beträgt  $-31.4^\circ$ .

Zur Erzeugung und Demonstration der Eignung dieser optischen Struktur für eine 2-Photonen-Anregung werden zwischen zwei Gitterstrukturen auf der Schicht (a) 1 Tropfen von je 0.5  $\mu\text{l}$  einer Rhodamin-Lösung (15.9  $\mu\text{M}$  Rhodamin B in Ethanol) aufgebracht, so dass die Rhodamin-Moleküle als Beispiel für lumineszenzfähige Moleküle nach Verdampfen des Ethanol auf der Schicht (a) verbleiben.

**2. Optisches System zur 2-Photonen-Anregung, Messverfahren zur 2-Photonen-Anregung und dessen Ergebnisse**

Als Anregungslichtquelle dient ein gepulster Titan-Sapphir-Laser mit Emission bei ca. 800 nm (Pulslänge: 100 fsec, Repetitionsrate: 80 MHz, eingesetzte mittlere Leistung: bis 0.6 W, spektrale Pulsbreite: 8 nm). Die Intensität des vom Laser ausgestrahlten Anregungslichts kann mit einem elektrooptischen Modulator kontinuierlich zwischen 0 % und 100 % der Ausgangsleistung reguliert werden; sie kann auch computergesteuert in diesem Bereich herauf- oder heruntergefahren werden.



Nach dem elektrooptischen Modulator können im Anregungsstrahlengang (in Richtung der optischen Struktur) Linsen eingesetzt werden, um auf dem Einkoppelgitter (c) der optischen Struktur parallel eingestrahlte Anregungslichtbündel gewünschter Geometrie zu erzeugen. Das eingestrahlte Anregungslicht wird über einen Spiegel umgelenkt auf das Einkoppelgitter (c) der optischen Struktur, welche auf einem Justierelement montiert ist, welches Translation in x- y- und z-Richtung (parallel und in den Achsen senkrecht zu den Gitterlinien) und Rotation (mit Drehachse übereinstimmend mit den Gitterlinien des Einkoppelgitters) erlaubt.

Zunächst wird, bei einer eingestrahnten Durchschnittsleistung von 0.4 W, ein kollimierter Strahl unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung auf das Einkoppelgitter geleitet. Dazu wird der Strahl mit einer Linse ( $f = 12.7$  cm) leicht fokussiert, mit dem Einkoppelgitter (Ebene der optischen Struktur) im „beam waste“, so dass das Anregungslicht dort als eine ebene Welle auftritt. Überraschenderweise wird, längs des in der optischen Struktur geführten Modes, im Bereich des immobilisierten Lumineszenz-Farbstoffs, eine so starke 2-Photonen-Fluoreszenz angeregt, dass sie sogar bei Raumlicht mit bloßem Auge beobachtbar ist. (Fig. 1, aufgenommen ohne Filter). Der Bildausschnitt zeigt die Halterung mit der darin montierten optischen Struktur. Der linke helle Lichtfleck markiert die Einkoppelposition des Anregungslichts auf dem Einkoppelgitter. Da dieses Bild ohne jegliche Filter aufgenommen wurde, ist die Intensität des am Gitter gestreuten Anregungslichts stark genug, dass es von der Kamera trotz abnehmender Empfindlichkeit bei langen Wellenlängen noch aufgezeichnet wird. Der eingekoppelte Mode (bei einer Wellenlänge von 800 nm) breitet sich in der Bildebene von links nach rechts aus. Bis zum Erreichen des Gebietes, in dem der Rhodamin-Farbstoff immobilisiert ist, ist der geführte Mode unsichtbar. In Mode-Ausbreitungsrichtung folgend, nach rechts, ist dann deutlich die mittels 2-Photonen-Anregung erzeugte Fluoreszenz des Rhodamin-Farbstoffs zu erkennen. Die zu beobachtende Lichtspur entspricht einer Länge von ca. 8 mm, bis zur nächsten Gitterstruktur, an der das geführte Anregungslicht wieder ausgekoppelt wird. Eine signifikante Abschwächung des geführten Lichts bzw. der angeregten 2-Photonen-Fluoreszenz ist längs der gesamten Distanz nicht erkennbar.

Fig. 2 zeigt in einem Querschnitt, parallel zu den Gitterlinien, das Profil der angeregten 2-Photonen-Fluoreszenz, aufgenommen mit einem IR-blockierenden Filter (BG 39) vor einer CCD-Kamera als Detektor. Das Anregungsstrahlprofil auf dem Gitter war auf eine theoretische Breite von ca.  $100\text{ }\mu\text{m}$  eingestellt, was gut mit der gemessenen Halbwertsbreite der Fluoreszenzspur ( $100\text{ }\mu\text{m}$ ) übereinstimmt. In diesem Beispiel konnte also linienhaft über eine Strecke von  $8\text{ mm}$  (auf einer Fläche von etwa  $2\text{ mm}^2$ , bei Zugrundelegung der Basisbreite des Fluoreszenzprofils, mittels 2-Photonen-Anregung Fluoreszenz erzeugt werden. Es ist zu beachten, dass die Ausbreitungslänge des geführten Anregungslichts und damit die Anregungsstrecke für die 2-Photonen-Anregung lediglich durch das Auskoppelgitter begrenzt ist.

Fig. 3 zeigt ein entsprechendes Fluoreszenzprofil für den direkt, ohne weitere strahlformende Linsen, eingestrahnten Laserstrahl. In diesem Fall beträgt die Halbwertsbreite des Fluoreszenzprofils ca.  $360\text{ }\mu\text{m}$ , die Basisbreite ca.  $800\text{ }\mu\text{m}$ , entsprechend einer (längs des Moden-Laufweges von  $8\text{ mm}$ ) auf einer Gesamtfläche von ca.  $6\text{ mm}^2$  mit 2-Photonen-Anregung erzeugten Fluoreszenz.

In einem weiteren Schritt wird dann der Laserstrahl mit einer Zylinderlinse ( $f = 40\text{ mm}$ ) parallel zu den Gitterlinien aufgeweitet. Aus dem entsprechenden Fluoreszenzprofil (Fig. 4) ergeben sich eine Halbwertsbreite von ca.  $1.7\text{ mm}$  und eine Basisbreite von ca.  $3\text{ mm}$ , entsprechend einer flächenhaft auf mehr als  $20\text{ mm}^2$  mittels 2-Photonen-Anregung erzeugten Fluoreszenz.

Ein wichtiges Kriterium zur zweifelsfreien Zurückführung einer angeregten Fluoreszenz auf 2-Photonen-Anregung ist die quadratische Abhängigkeit ihrer Intensität von der eingestrahnten Anregungsintensität. Dazu wird, anstelle der CCD-Kamera, eine Si-Photodiode, verbunden mit einem Lock-in-Verstärker (Chopper-Frequenz:  $2\text{ kHz}$ ), als Detektor verwendet. Die isotrop abgestrahlte, mittels 2-Photonen-Anregung im evaneszenten Feld der Wellenleiter-Struktur erzeugte Fluoreszenz wird mit einer Linse auf besagte Photodiode, vor der sich wiederum ein IR-blockierender Filter (BG 39)

befindet, fokussiert. Mithilfe des computergesteuerten elektrooptischen Modulators wird die auf die optische Struktur eingestrahlte Anregungsintensität in Inkrementen von ca. 6 mW von 0 auf nahe 300 mW (eingestrahlte Durchschnittsleistung) erhöht und jeweils die erzeugte Fluoreszenzintensität gemessen. Fig. 5 zeigt die gemessenen Fluoreszenzintensitäten und – als durchgezogene Linie – eine Kurvenanpassung der Intensität nach der Gleichung  $y = ax^2$  (mit  $y$  entsprechend der Fluoreszenzintensität,  $x$  entsprechend der Anregungsintensität,  $a$  entsprechend einem Fitparameter). Es zeigt sich überraschenderweise eine perfekte quadratische Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzintensität von der Anregungslichtintensität, ohne jeglichen Offset, welcher einem zusätzlichen Hintergrundsignal entsprechen würde. Damit demonstriert dieses Beispiel, dass die gemessene Fluoreszenz eindeutig auf 2-Photonen-Anregung zurückzuführen ist und diese, unter diesen Versuchsbedingungen, frei von Hintergrundsignalen, angeregt werden kann.

#### **Beispiel 2: Weiteres optisches System zur 2-Photonen-Anregung**

Als Anregungslichtquelle dient eine Hochleistungslaserdiode mit Emissionswellenlänge 810 nm (fasergekoppelt, 10 W). Mit einer nach der Faser angeordneten Strahlformungsoptik wird ein paralleles Anregungsstrahlenbündel gewünschter Form erzeugt und unter dem Koppelwinkel für die Einkopplung in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur auf das Gitter (Periode 360 nm, Gittertiefe 12 nm) eingestrahlt. Der Einkoppelwinkel im Glassubstrat (optische Schicht (b),  $n = 1.496$  bei 810 nm) beträgt  $-21.7^\circ$  (beim Übergang des Lichts von der Schicht (b) zur Schicht (a)); der äussere Einstrahlwinkel beträgt  $-34.1^\circ$ . Die wellenleitende Schicht (a) beträgt 150 nm Tantalpentoxid ( $n = 2.09$  bei 810 nm). Mit diesen Parametern kann ein Anteil von 24 % in die Schicht (a) eingekoppelt werden, und die Anregungsintensität an der Oberfläche der Schicht (a) ist ausreichend für eine 2-Photonen-Anregung.

### Patentansprüche

1. Optische Struktur, umfassend einen optischen Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle oder molekulare Gruppen mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
2. Optische Struktur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem optischen Wellenleiter um einen optischen Dünnschichtwellenleiter handelt, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a).
3. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) durch Multi-Photonen-Anregung angeregten Molekülen um photoreaktive, d.h. nach Lichtanregung chemisch reaktive Moleküle oder molekulare Gruppen handelt.
4. Optische Struktur nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photopolymerisation ausgelöst wird.
5. Optische Struktur nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine Photodissoziation, d.h. Aufspaltung eines bis zu der Multi-Photonen-Anregung

bestehenden Moleküls oder molekularen Komplexes auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zu der Schicht (a) ausgelöst wird.

6. Optische Struktur nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass besagte photoreaktive Moleküle Bestandteil einer Molekülmatrix zur Einbettung von Molekülen höheren Molekulargewichts, insbesondere von natürlichen und künstlichen Polymeren bzw. von biologischen Molekülen wie Proteinen, Polypeptiden und Nukleinsäuren, sind.
7. Optische Struktur nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich hierbei um einen Probenträger für die Massenspektrometrie, vorzugsweise für MALDI/TOF-MS (matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry) handelt.
8. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 7, umfassend einen optischen Dünnschicht-Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten, wellenleitenden Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die Schicht (a) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.
9. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über ein oder mehrere optische Einkoppelemente aus der Gruppe erfolgt, die von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der wellenleitenden Schicht angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern gebildet wird.

10. Optische Struktur nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) erfolgt.
11. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich hierbei um eine planare Dünnschicht-Wellenleiter-Struktur handelt.
12. Optische Struktur nach Anspruch 11, umfassend einen planaren Dünnschicht-Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahnten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) zumindest im Bereich der Gitterstruktur (c) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
13. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 12, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Multi-Photonen-Anregung um eine 2-Photonen-Anregung handelt.
14. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 13, dadurch gekennzeichnet, dass sie es ermöglicht, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle linienhaft, das heisst gleichzeitig längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
15. Optische Struktur nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass sie linienhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen längs einer

Distanz von mindestens 5 mm, gerechnet vom Ort der Einkopplung des Anregungslichts in die Schicht (a), ermöglicht.

16. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 15, dadurch gekennzeichnet, dass sie es ermöglicht, unter Einstrahlung eines aufgeweiteten Anregungslichts, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle gleichzeitig flächenhaft längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
17. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 16, dadurch gekennzeichnet, dass sie gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 1 mm<sup>2</sup> ermöglicht.
18. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 16, dadurch gekennzeichnet, dass sie gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 10 mm<sup>2</sup> ermöglicht.
19. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 16, dadurch gekennzeichnet, dass sie gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 1 cm<sup>2</sup> ermöglicht.
20. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 – 19, dadurch gekennzeichnet, dass sie gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind.
21. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 – 20, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit

optional daran anschliessenden gleichförmigen, unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfasst.

22. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 8 – 21, dadurch gekennzeichnet, dass eine auf oder im Nahfeld der Schicht (a) durch Multi-Photonen-Anregung erzeugte Lumineszenz mindestens teilweise in die Schicht (a) einkoppelt und durch Leitung in der Schicht (a) zu benachbarten Bereichen auf besagter optischer Struktur geführt wird.
23. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 12 - 22, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Überlagerung von 2 oder mehreren Gitterstrukturen unterschiedlicher Periodizität mit zueinander paralleler oder nicht paralleler, vorzugsweise nicht paralleler Ausrichtung der Gitterlinien umfasst, welche der Einkopplung von Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge dient, wobei im Falle von 2 überlagerten Gitterstrukturen deren Gitterlinien vorzugsweise senkrecht zueinander ausgerichtet sind.
24. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 2 - 23, dadurch gekennzeichnet, dass sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm – 10 000 nm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet.
25. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 – 22 oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) ein diffraktives Gitter mit einer einheitlichen Periode oder ein multidiffraktives Gitter ist.
26. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 - 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) eine senkrecht oder parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelten Anregungslichts räumlich variierende Periodizität aufweist.



27. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Material der optisch transparenten Schicht (a) aus Glas, Quarz oder einem transparenten Kunststoff besteht, beispielsweise aus der Gruppe, welche Polycarbonat, Polyamid, Polyimid, Polymethylmethacrylat, Polypropylen, Polystyrol, Polyethylen, Polyacrylsäure, Polyacrylester, Polythioester, Polyphenylensulfid Polyethylenterephthalat (PET) und Polyurethan sowie deren Derivate umfasst.
28. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 27, dadurch gekennzeichnet, dass die optisch transparente Schicht (a) ein Material aus der Gruppe von  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{HfO}_2$ , oder  $\text{ZrO}_2$ , besonders bevorzugt aus  $\text{TiO}_2$  oder  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  oder  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ , umfasst.
29. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 28, dadurch gekennzeichnet, dass der Brechungsindex der optisch transparenten Schicht (a) grösser als 1.8 ist.
30. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 29, dadurch gekennzeichnet, dass die optisch transparente Schicht (a) selbsttragend ist.
31. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 29, dadurch gekennzeichnet, dass die optisch transparente Schicht (a) ein niedermodaler Wellenleiter ist, d.h. weniger als die ersten 10 Moden einer vorgegebenen Polarisation einer eingestrahnten Anregungswellenlänge führen kann.
32. Optische Struktur nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die optisch transparente Schicht (a) ein niedermodaler Wellenleiter ist, welcher nur 1 - 3 Moden einer vorgegebenen Polarisation einer eingestrahnten Anregungswellenlänge führen kann.
33. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 2 - 32, dadurch gekennzeichnet, dass das Material der optisch transparenten Schicht (b) aus Glas, Quarz oder einem

transparenten thermoplastischen oder spritzbaren Kunststoff, beispielsweise aus der Gruppe besteht, die von Polycarbonat, Polyimid, Polymethylmethacrylat, Polypropylen, Polystyrol, Polyethylen, Polyethylenterephthalat (PET) oder Polyurethan gebildet wird.

34. Optische-Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 33, dadurch gekennzeichnet, dass das Produkt aus der Dicke der Schicht (a) und ihrem Brechungsindex ein Zehntel bis ein Ganzes, bevorzugt ein Zehntel bis zwei Drittel, der Anregungswellenlänge eines in die Schicht (a) einzukoppelnden Anregungslichts beträgt.
35. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 - 34, dadurch gekennzeichnet, dass in der Schicht (a) modulierte Gitterstrukturen (c) eine Periode von 200 nm – 1000 nm aufweisen und ihre Modulationstiefe 3 bis 100 nm, bevorzugt 10 bis 30 nm beträgt.
36. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 - 35, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,2 ist.
37. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 – 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) ein Reliefgitter mit Rechteck-, Dreieck- oder halbkreisförmigem Profil oder ein Phasen- oder Volumengitter mit einer periodischen Modulation des Brechungsindex in der im wesentlichen planaren optisch transparenten Schicht (a) ist.
38. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 37, dadurch gekennzeichnet, dass sie mit optisch oder mechanisch erkennbaren Markierungen zur Erleichterung der Justierung in einem optischen System und / oder zur Verbindung mit Probenbehältnissen als Teil eines analytischen Systems versehen ist.
39. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 38, dadurch gekennzeichnet, dass zur Immobilisierung biologischer oder biochemischer oder synthetischer Erkennungselemente (e) zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer

zugeführten Probe auf der optisch transparenten Schicht (a) eine Haftvermittlungsschicht (f) mit einer Stärke von vorzugsweise weniger als 200 nm, besonders bevorzugt von weniger als 20 nm aufgebracht ist, und dass die Haftvermittlungsschicht (f) vorzugsweise eine chemische Verbindung aus den Gruppen umfasst, die Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und "selbstorganisierte funktionalisierte Monoschichten" umfasst.

40. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 39, dadurch gekennzeichnet, dass räumlich getrennte Messbereiche (d) durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf besagter Wellenleiter-Struktur erzeugt werden, vorzugsweise unter Verwendung eines oder mehrerer Verfahren aus der Gruppe von Verfahren, die von "Ink jet spotting, mechanischem Spotting, micro contact printing, fluidische Kontaktierung der Messbereiche mit den biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen", gebildet wird.
41. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 40, dadurch gekennzeichnet, dass als besagte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente Komponenten aus der Gruppe aufgebracht werden, die von Nukleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonukleotiden) und Nukleinsäureanaloge (z. B. PNA), Antikörpern oder Antikörperfragmenten, Aptameren, membrangebundenen und isolierten Rezeptoren, deren Liganden, Antigenen für Antikörper, "Histidin-Tag-Komponenten", durch chemische Synthese erzeugte Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, natürlichen und künstlichen Polymeren, etc. gebildet wird, oder dass als biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente ganze Zellen oder Zellfragmente aufgebracht werden, wobei diese Erkennungselemente direkt auf der optischen Struktur oder vermittelt über eine Haftvermittlungsschicht nach Anspruch 39 auf der optischen Struktur aufgebracht werden.

42. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 40 - 41, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den räumlich getrennten Messbereichen (d) gegenüber dem Analyten "chemisch neutrale" Verbindungen aufgebracht sind, vorzugsweise beispielsweise bestehend aus den Gruppen, die von Albuminen, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierender, fragmentierter natürlicher oder synthetischer DNA, wie beispielsweise von Herings- oder Lachssperma, oder auch ungeladenen, aber hydrophilen Polymeren, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, gebildet werden.
43. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 40 - 42, dadurch gekennzeichnet, dass zwei oder mehrere räumlich getrennte Messbereiche jeweils zu Segmenten auf der optischen Struktur zusammengefasst sind und dass bevorzugt verschiedene Segmente zusätzlich durch eine aufgebrachte Berandung, welche zur fluidischen Abdichtung gegen Nachbarbereiche und / oder zu einer weiteren Verminderung optischen Übersprechens zwischen benachbarten Segmenten beiträgt, gegeneinander abgegrenzt sind.
44. Optische Struktur nach einem der Ansprüche 40 - 43, dadurch gekennzeichnet, dass in einer 2-dimensionalen Anordnung bis zu 1 000 000 Messbereiche angeordnet sind und ein einzelner Messbereich eine Fläche von  $0.001 - 6 \text{ mm}^2$  einnimmt.
45. Optisches System zur Multi-Photonen-Anregung, umfassend mindestens eine Anregungslichtquelle und eine optische Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 44, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

46. Optisches System zur Multi-Photonen-Anregung nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.
47. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 46, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über ein oder mehrere optische Einkoppelemente aus der Gruppe erfolgt, die von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der wellenleitenden Schicht angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern gebildet wird.
48. Optisches System nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) erfolgt.
49. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 48, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagter optischer Struktur um eine planare Dünnschicht-Wellenleiter-Struktur handelt.
50. Optisches System nach Anspruch 49, umfassend mindestens eine Anregungslichtquelle und eine optische Struktur nach einem der Ansprüche 10 - 44, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) auf eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) der optischen Struktur eingestrahlten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) zumindest im Bereich der Gitterstruktur (c) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.

51. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 50, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Multi-Photonen-Anregung um eine 2-Photonen-Anregung handelt.
52. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 51, dadurch gekennzeichnet, dass es ermöglicht, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle linienhaft, das heisst gleichzeitig längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
53. Optisches System nach Anspruch 52, dadurch gekennzeichnet, dass es linienhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen längs einer Distanz von mindestens 5 mm, gerechnet vom Ort der Einkopplung des Anregungslichts in die Schicht (a), ermöglicht.
54. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 53, dadurch gekennzeichnet, dass es ermöglicht, unter Einstrahlung eines aufgeweiteten Anregungslichts, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle gleichzeitig flächenhaft längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
55. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 54, dadurch gekennzeichnet, dass es gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens 1 mm<sup>2</sup> ermöglicht.
56. Optisches System nach einem der Ansprüche 46 - 54, dadurch gekennzeichnet, dass eine auf oder im Nahfeld der Schicht (a) der optischen Struktur durch Multi-Photonen-Absorption erzeugte Lumineszenz mindestens teilweise in die Schicht (a)

einkoppelt und durch Leitung in der Schicht (a) zu benachbarten Bereichen auf besagter optischer Struktur geführt wird.

57. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 – 56, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich mindestens einen Detektor zur Erfassung einer oder mehrerer Lumineszenzen von der optischen Struktur umfasst.
58. Optisches System nach einem der Ansprüche 48 - 57, dadurch gekennzeichnet, dass das von der mindestens einen Anregungslichtquelle ausgesandte Anregungslicht im wesentlichen parallel ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.
59. Optisches System nach einem der Ansprüche 48 - 58, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von mindestens einer Lichtquelle mit einer Aufweitungsoptik zu einem im wesentlichen parallelen Strahlenbündel aufgeweitet wird und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine grossflächige in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.
60. Optisches System nach einem der Ansprüche 48 - 59, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von der mindestens einen Lichtquelle durch ein oder, im Falle mehrerer Lichtquellen, gegebenenfalls mehrere diffraktive optische Elemente, vorzugsweise Dammann-Gitter, oder refraktive optische Elemente, vorzugsweise Mikrolinsen-Arrays, in eine Vielzahl von Einzelstrahlen möglichst gleicher Intensität der von einer gemeinsamen Lichtquelle stammenden Teilstrahlen zerlegt wird, welche jeweils im wesentlichen parallel zueinander auf Gitterstrukturen (c) unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahlt werden.
61. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 60, dadurch gekennzeichnet, dass als Anregungslichtquellen zwei oder mehrere Lichtquellen mit gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

62. Optisches System nach Anspruch 61 mit einer optischen Struktur nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von 2 oder mehr Lichtquellen gleichzeitig oder sequentiell aus verschiedenen Richtungen auf eine Gitterstruktur (c) eingestrahlt und über diese in die Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelt wird, welche eine Überlagerung von Gitterstrukturen mit unterschiedlicher Periodizität umfasst.
63. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 62, dadurch gekennzeichnet, dass zur Detektion mindestens ein ortsauflösender Detektor verwendet wird, beispielsweise aus der Gruppe, die von CCD-Kameras, CCD-Chips, Photodioden-Arrays, Avalanche-Dioden-Arrays, Multichannelplates und Vielkanal-Photomultipliern gebildet wird.
64. Optisches System nach einem der Ansprüche 45 - 63, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der einen oder mehreren Anregungslichtquellen und der optischen Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 44 und /oder zwischen besagter optischer Struktur und dem einen oder mehreren Detektoren optische Komponenten aus der Gruppe verwendet werden, die von Linsen oder Linsensystemen zur Formgestaltung der übertragenen Lichtbündel, planaren oder gekrümmten Spiegeln zur Umlenkung und gegebenenfalls zusätzlich zur Formgestaltung von Lichtbündeln, Prismen zur Umlenkung und gegebenenfalls zur spektralen Aufteilung von Lichtbündeln, dichroischen Spiegeln zur spektral selektiven Umlenkung von Teilen von Lichtbündeln, Neutralfiltern zur Regelung der übertragenen Lichtintensität, optischen Filtern oder Monochromatoren zur spektral selektiven Übertragung von Teilen von Lichtbündeln oder polarisationsselektiven Elementen zur Auswahl diskreter Polarisationsrichtungen des Anregungs- und / oder Lumineszenzlichts gebildet werden.
65. Optisches System nach einem der Ansprüche 46 - 64, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstrahlung des Anregungslichts in Pulsen mit einer Dauer zwischen 1 fsec und



10 Minuten erfolgt und gegebenenfalls das Emissionslicht aus den Messbereichen zeitlich aufgelöst gemessen wird.

66. Optisches System nach einem der Ansprüche 46 - 65, dadurch gekennzeichnet, dass zur Referenzierung Lichtsignale aus der Gruppe gemessen werden, die von Anregungslicht am Ort der Lichtquellen oder nach ihrer Aufweitung oder nach ihrer Unterteilung in Teilstrahlen, Streulicht bei der Anregungswellenlänge aus dem Bereich der einen oder mehreren räumlich getrennten Messbereiche, und über die Gitterstruktur (c) neben den Messbereichen ausgekoppeltem Licht der Anregungswellenlänge gebildet werden.
67. Optisches System nach einem der Ansprüche 46 - 66, dadurch gekennzeichnet, dass die Messbereiche zur Bestimmung des Emissionslichts und eines Referenzsignals identisch sind.
68. Optisches System nach einem der Ansprüche 46 - 67, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstrahlung des Anregungslichts auf und Detektion des Emissionslichts von einem oder mehreren Messbereichen sequentiell für einzelne oder mehrere Messbereiche erfolgt.
69. Optisches System nach Anspruch 68, dadurch gekennzeichnet, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung beweglicher optischer Komponenten erfolgt, die aus der Gruppe von Spiegeln, Umlenkprismen und dichroischen Spiegeln gebildet wird.
70. Optisches System nach Anspruch 69, dadurch gekennzeichnet, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung eines im wesentlichen winkel- und fokusgetreuen Scanners erfolgt.

71. Optisches System nach einem der Ansprüche 68 - 70, dadurch gekennzeichnet, dass die optische Struktur zwischen Schritten der sequentiellen Anregung und Detektion bewegt wird.
72. Verfahren zur Multi-Photonen-Anregung, unter Verwendung einer optischen Struktur nach einem der Ansprüche 1 - 44 und / oder eines optischen Systems nach einem der Ansprüche 45 - 71, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
73. Verfahren nach Anspruch 72, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) der optischen Struktur befindliche Moleküle photoreaktiv sind und durch Multi-Photonen-Anregung zu einer chemischen Reaktion angeregt werden.
74. Verfahren nach Anspruch 73, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) der optischen Struktur befindliche Moleküle durch Multi-Photonen-Anregung zu einer Bindung mit anderen Molekülen angeregt werden.
75. Verfahren nach Anspruch 74, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) der optischen Struktur befindliche Moleküle durch Multi-Photonen-Anregung zu einer Photopolymerisation angeregt werden.
76. Verfahren nach Anspruch 73, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Multi-Photonen-Anregung besagter photoreaktiver Moleküle auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlicher Moleküle eine

Photodissoziation, d.h. Aufspaltung eines bis zu der Multi-Photonen-Anregung bestehenden Moleküls oder molekularen Komplexes auf der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zu der Schicht (a) ausgelöst wird.

77. Verfahren zur Lumineszenzanregung, unter Verwendung einer optischen Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 44 und / oder eines optischen Systems nach einem der Ansprüche 45 – 71, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.
78. Verfahren zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten in einer oder mehreren Proben auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer optischen Struktur nach einem der Ansprüche 39 – 44 zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von einem Messbereich oder von einem Array aus mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, auf besagter optischer Struktur, dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines in die wellenleitende Schicht (a) der optischen Struktur eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung zur Lumineszenz anzuregen.
79. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 - 78, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über ein oder mehrere optische Einkoppelemente aus der Gruppe erfolgt, die von Prismenkopplern, evaneszenten Kopplern mit zusammengebrachten optischen Wellenleitern mit überlappenden evaneszenten Feldern, Stirnflächenkopplern mit vor einer Stirnseite der

wellenleitenden Schicht angeordneten fokussierenden Linsen, vorzugsweise Zylinderlinsen, und Gitterkopplern gebildet wird.

80. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 – 79, dadurch gekennzeichnet, dass die Einkopplung von Anregungslicht in die Schicht (a) über eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) erfolgt.
81. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 – 80, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der optischen Struktur um eine planare Dünnschicht-Wellenleiter-Struktur handelt.
82. Verfahren nach Anspruch 81 mit einer optischen Struktur umfassend einen planaren Dünnschicht-Wellenleiter, mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c), dadurch gekennzeichnet, dass die Intensität eines unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahnten Anregungslichts auf der Schicht (a) und in der Schicht (a) zumindest im Bereich der Gitterstruktur (c) ausreichend hoch ist, um auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle mittels Multi-Photonen-Anregung anzuregen.
83. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 – 82, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Multi-Photonen-Anregung um eine 2-Photonen-Anregung handelt.
84. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 – 83, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche der Schicht (a) der optischen Struktur oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle linienhaft, das heisst gleichzeitig längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts, mittels Multi-Photonen-Anregung angeregt werden können.

85. Verfahren nach Anspruch 84, dadurch gekennzeichnet, dass linienhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen längs einer Distanz von mindestens 5 mm, gerechnet vom Ort der Einkopplung des Anregungslichts in die Schicht (a), möglich ist.
86. Verfahren nach einem der Ansprüche 80 - 85, dadurch gekennzeichnet, dass, unter Einstrahlung eines aufgeweiteten Anregungslichts, auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindliche Moleküle gleichzeitig flächenhaft längs des in der Schicht (a) geführten Anregungslichts mittels Multi-Photonen-Anregung angeregt werden können.
87. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 - 86, dadurch gekennzeichnet, dass es gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens  $1 \text{ mm}^2$  ermöglicht.
88. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 - 87, dadurch gekennzeichnet, dass es gleichzeitige flächenhafte Multi-Photonen-Anregung von auf der Oberfläche der Schicht (a) oder in einem Abstand von weniger als 200 nm zur Schicht (a) befindlichen Molekülen auf einer Fläche von mindestens  $1 \text{ cm}^2$  ermöglicht.
89. Verfahren nach einem der Ansprüche 80 - 88, dadurch gekennzeichnet, dass die optische Struktur gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind.
90. Verfahren nach einem der Ansprüche 80 - 89, dadurch gekennzeichnet, dass die optische Struktur eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit optional daran anschliessenden gleichförmigen,

unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfasst.

91. Verfahren nach einem der Ansprüche 80 – 90, dadurch gekennzeichnet, dass eine auf oder im Nahfeld der Schicht (a) der optischen Struktur durch Multi-Photonen-Absorption erzeugte Lumineszenz mindestens teilweise in die Schicht (a) einkoppelt und durch Leitung in der Schicht (a) zu benachbarten Bereichen auf besagter optischer Struktur geführt wird.
92. Verfahren nach einem der Ansprüche 77 - 91, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erzeugung der Lumineszenz ein Lumineszenzfarbstoff oder lumineszentes Nanopartikel als Lumineszenzlabel verwendet wird, das bei einer Wellenlänge zwischen 200 nm und 1100 nm angeregt werden kann.
93. Verfahren nach Anspruch 92, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes Lumineszenzlabel mittels 2-Photonen-Absorption angeregt wird.
94. Verfahren nach Anspruch 93, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes Lumineszenzlabel durch 2-Photonen-Absorption eines Anregungslichts im Sichtbaren oder nahen Infraroten zu einer ultravioioletten oder blauen Lumineszenz angeregt wird.
95. Verfahren nach einem der Ansprüche 92 - 94, dadurch gekennzeichnet, dass das Lumineszenzlabel an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen oder an die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen gebunden ist.
96. Verfahren nach einem der Ansprüche 92 – 95, dadurch gekennzeichnet, dass ein zweites oder noch weitere Lumineszenzlabel mit gleicher oder unterschiedlicher

Anregungswellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

97. Verfahren nach einem der Ansprüche 77 – 91, dadurch gekennzeichnet, dass die Eigenfluoreszenz („Autofluoreszenz“) fluoreszenzfähiger Biomoleküle, wie beispielsweise von Proteinen mit fluoreszenzfähigen Aminosäuren, mittels Multi-Photonen-Absorption angeregt wird.
98. Verfahren nach Anspruch 97, dadurch gekennzeichnet, dass besagte fluoreszenzfähigen Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe, die von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin gebildet wird.
99. Verfahren nach einem der Ansprüche 77 – 98, dadurch gekennzeichnet, dass mithilfe einer mittels Multi-Photonen-Absorption angeregten Eigenlumineszenz (Eigen- oder Auto-Fluoreszenz) der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente deren Immobilisierungsdichte in den Messbereichen bestimmt wird.
100. Verfahren nach einem der Ansprüche 77 – 99, dadurch gekennzeichnet, dass das im Analytnachweisschritt (durch Multi-Photonen-Absorption oder auch Ein-Photonen-Absorption) angeregte Lumineszenzsignal des Analyten oder eines seiner Bindungspartner bezüglich der Anzahl oder Dichte der verfügbaren Bindungsstellen anhand der gemessenen, durch Multi-Photonen-Absorption angeregten Eigenlumineszenz der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente korrigiert bzw. normiert wird.
101. Verfahren nach einem der Ansprüche 77 – 100, dadurch gekennzeichnet, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden, wobei vorzugsweise die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisation als der des Anregungslichts gemessen werden.

102. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 – 101, dadurch gekennzeichnet, dass während der Multi-Photonen-Anregung von an der Oberfläche der Schicht (a) oder innerhalb eines Abstandes von weniger als 200 nm von der Schicht (a) befindliche Moleküle innerhalb dieses Abstandes gefangen gehalten werden, indem die oberflächennahe hohe Anregungsintensität und deren ansteigender Gradient in Richtung der Oberfläche auf diese Moleküle den Effekt einer „optischen Pinzette“ („optical tweezers“) ausübt.
103. Verfahren nach einem der Ansprüche 72 – 102 zur gleichzeitigen und / oder sequentiellen, quantitativen und / oder qualitativen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren oder „Histidin-tag-Komponenten“, Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.
104. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 72 – 103, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchenden Proben natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Eigelb oder optisch trübe Flüssigkeiten oder Oberflächenwasser oder Boden- oder Pflanzenextrakte oder Bio- oder Syntheseprozessbrühen oder aus biologischen Gewebeteilen entnommen sind.
105. Verwendung einer optischen Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 44 und / oder eines optischen Systems nach einem der Ansprüche 45 – 71 und / oder eines Verfahrens nach mindestens einem der Ansprüche 72 – 104 zu quantitativen und / oder qualitativen Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätsscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen



Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Expressionsprofilen sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktentwicklung und -forschung, der Human- und Veterinärdiagnostik, der Agrochemischen Produktentwicklung und -forschung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen und Bakterien, in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

106. Verwendung einer optischen Struktur nach einem der Ansprüche 1 – 44 und / oder eines optischen Systems nach einem der Ansprüche 45 – 71 und / oder eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 72 – 104 für oberflächengebundene Untersuchungen, welche den Einsatz sehr hoher Anregungslichtintensitäten und / oder Anregungsdauern und / oder Mehr-Photonen-Anregung erfordern, wie beispielsweise Untersuchungen der photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften insbesondere neuer Materialien, Studien zur Photostabilität von Materialien, photokatalytische Prozesse etc.

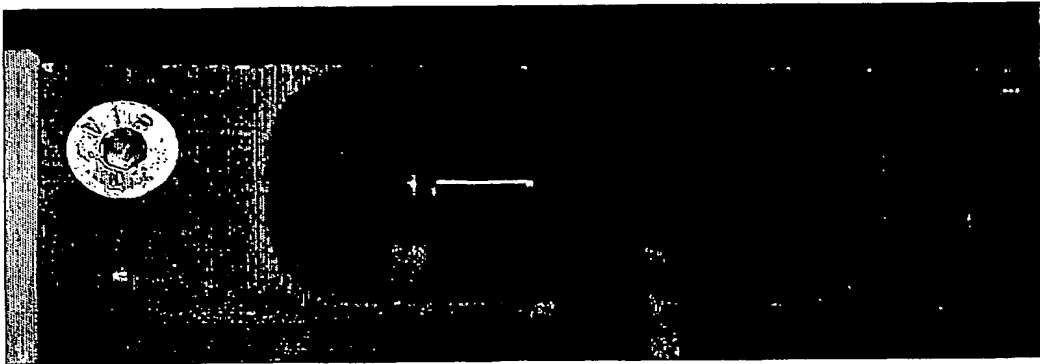


Fig. 1

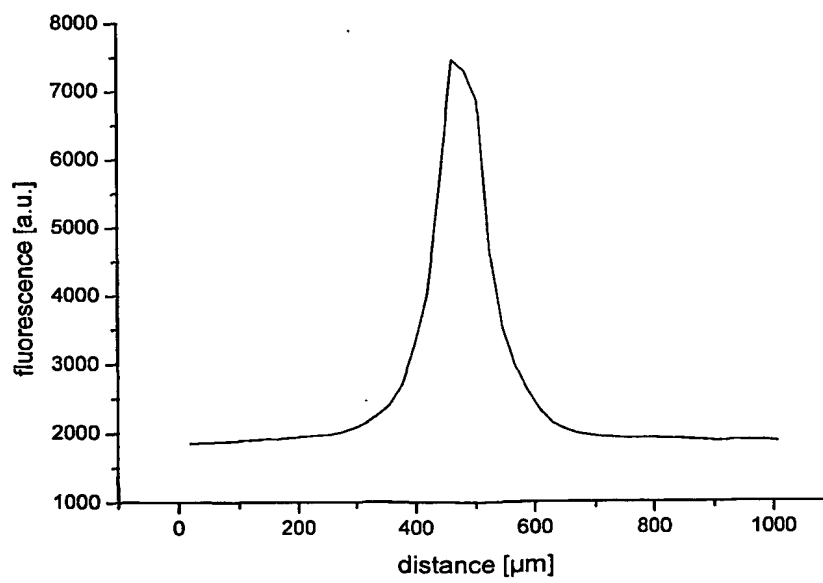
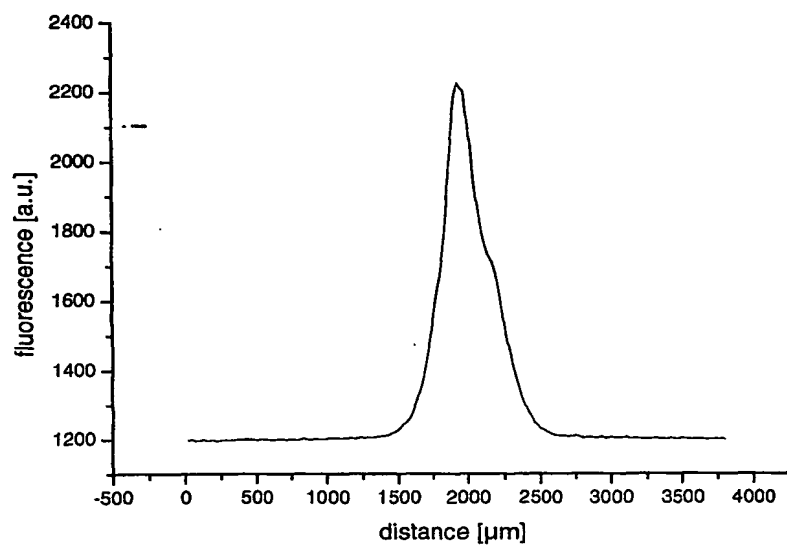
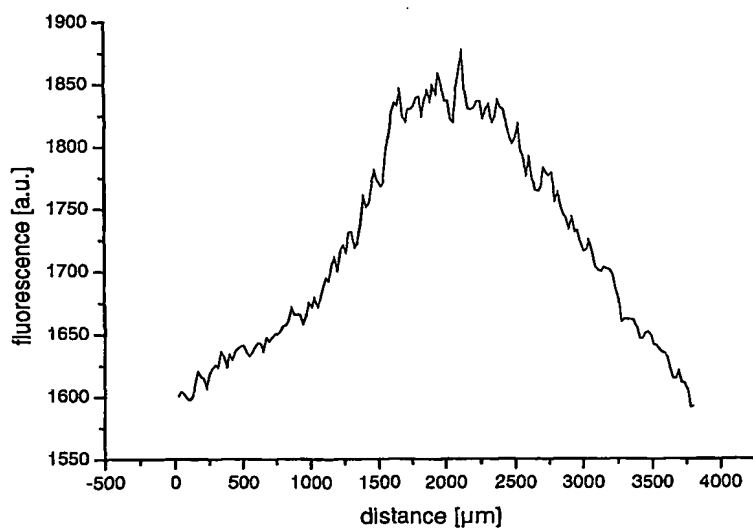
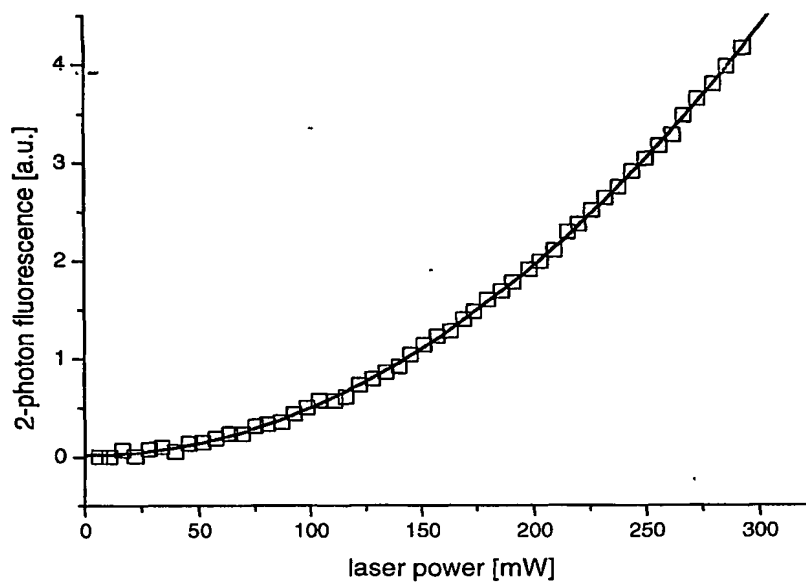


Fig. 2

**Fig. 3****Fig. 4**

**Fig. 5**